

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA MONEGO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA RESISTÊNCIA
A ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE MICOBACTÉRIAS DE
CRESCIMENTO RÁPIDO COLETADOS NO PARANÁ

CURITIBA 2011

FERNANDA MONEGO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DA RESISTÊNCIA
A ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE MICOBACTÉRIAS DE
CRESCIMENTO RÁPIDO COLETADOS NO PARANÁ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Orientador:

Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA
2011

Doutoranda bolsista (Reuni/Capes): Fernanda Monego
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Período de Março de 2008 a Novembro de 2011
Departamento de Biologia Celular e Molecular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Profº. Dr. Alexander Welker Biondo

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital do Trabalhador


Projeto de Pesquisa nº 244690

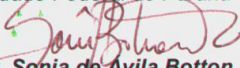
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)


PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Co-Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Sonia de Avila Botton
Universidade Federal de Santa Maria


Prof. Dr. Cristina Leise Bastos Monteiro
Universidade Federal do Paraná


Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior
Pontifícia Universidade Católica do Paraná


Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Instituto Carlos Chagas

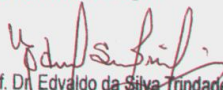
E tendo como suplentes,

Profa. Dra. Andréa Emilia M Stinghen
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth
Universidade Federal do Paraná

Após argüir a doutoranda **Fernanda Monego**, em relação ao seu trabalho intitulado: "**Caracterização e análise da resistência a antimicrobianos em isolados de micobactérias de crescimento rápido coletados no Paraná**" são de parecer favorável à aprovção da acadêmica, habilitando-a ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 24 de novembro de 2011


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo, meu orientador, agradeço pela oportunidade de realizar este doutorado.

Minha gratidão a toda equipe do LACEN-PR, em especial a Dra. Sueli Nakatani, Irina Riediger, Sônia Brockelt e Lavínia, sem as quais minha pesquisa não seria possível. Agradeço a vocês a minha formação, meu conhecimento adquirido e a oportunidade de aprendizado.

Agradeço aos coordenadores e professores do Programa de Biologia Celular, pois hoje eu sou o que vocês me ensinaram. Mais uma vez, obrigada.

Ao Prof. Dr. Rafael Duarte, agradeço pela confiança e preciosa colaboração nestes anos. Obrigada pelo incentivo e generosidade em partilhar sua experiência.

Agradeço as minhas colegas de curso, que tornara-se minhas amigas. Em especial a Loli, Gina, Irina, Fernanda, Sandra e Marina. Com vocês partilhei muitas reclamações, mas também vivi momentos que jamais serão esquecidos. Agradeço de coração por tudo que passamos juntas.

A Amanda e Mary, amigas muito queridas, que me incentivaram a seguir em frente e principalmente me apoiaram nas minhas decisões. Agradeço por tudo que passamos e pelos momentos que ainda compartilharemos.

Aos meu pais, Cleonice e Leinor, pela compreensão nas horas de ausência, pelo incentivo recebido e por estarem sempre presente na minha vida.

Ao meu noivo, Leonard Ahlin, pelo apoio nas horas de desânimo, pelo incentivo nos momentos de dúvida, pela paciência nos momentos de crise e por sua admiração ao meu trabalho. Isso fez tudo valer à pena!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
1.INTRODUÇÃO	18
2.OBJETIVOS	19
Objetivo Geral.....	19
Objetivos Específicos.....	19
3.REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 INTRODUÇÃO GERAL SOBRE MICOBACTÉRIAS.....	20
3.2 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO	21
3.3 MICOBACTÉRIAS NÃO – TUBERCULOSAS (MNT)	22
3.4 INTERAÇÕES COM O HOSPEDEIRO E O AMBIENTE	25
3.4.1 Aspectos imunológicos.....	25
3.4.2 Fatores de virulência	26
3.4.3 Formação de Biofilmes.....	27
3.5 INFECÇÕES POR MCR	28
3.6 TRATAMENTO DAS INFECÇÕES	31
3.7 RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	33
3.7.1 Quinolonas: mecanismo de ação e atividade antibacteriana	35
3.7.2 Mecanismos de resistência às quinolonas	37
3.7.3 Bombas de efluxo e o desenvolvimento de resistência.....	38
3.7.4 Bombas de efluxo transportando quinolonas	40
3.7.5 Tetraciclinas: mecanismo de ação e atividade antibacteriana.....	43
3.7.6 Bombas de efluxo transportando tetraciclinas.....	44
3.8 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	45
3.8.1 Identificação Fenotípica	45
3.8.2 Identificação Molecular.....	47
3.8.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	49
3.9 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	50

3.9.1 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	50
3.9.2 Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)	51
3.9.3 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	52
4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Aspectos gerais e procedimentos microbiológicos	53
4.2 Extração do DNA	54
4.3 Identificação da espécie	54
4.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	55
4.5 Teste de tolerância ao glutaraldeído	57
4.6 Análise pela técnica de PFGE	57
4.7 PCR e sequenciamento dos genes gyrA e gyrB	60
4.8 Amplificação e sequenciamento dos genes tap e lfrA	61
5. RESULTADOS	63
5.1 Achados clínicos e descrição do surto	63
5.2 Identificação das espécies	63
5.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	65
5.4 Teste de tolerância ao glutaraldeído	65
5.5 Análise da técnica de PFGE	67
5.6 PCR e sequenciamento dos genes gyrA e gyrB	71
5.7 Amplificação e sequenciamento dos genes tap e lfrA	75
6. DISCUSSÃO	79
6.1 IDENTIFICAÇÃO E TIPIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE Mycobacterium massiliense	79
6.2 MUTAÇÕES NOS GENES gyrA E gyrB EM ISOLADOS RESISTENTES A CIPROFLOXACINA	87
6.3 BOMBAS DE EFLUXO E PERFIL DE RESISTÊNCIA EM MCR	91
7. CONCLUSÃO	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Estrutura química das quinolonas.....	34
FIGURA 2 – Estrutura química das tetraciclinas.....	42
FIGURA 3 – PFGE utilizando a enzima <i>DraI</i> de isolados de <i>M. massiliense</i> provenientes de um surto em Curitiba. M, marcadores de tamanho molecular (DNA Lambda variando de 48,5 a 1.018,5 kb); posição 1, CRM-587; posição 2, CRM-591; posição 3, CRM-592; posição 4, CRM-593; posição 5, CRM- 595; posição 6, CRM-596; posição 7, CRM-598; posição 8, CRM-602 e posição 9, CRM-604.....	67
FIGURA 4 - PFGE utilizando a enzima <i>SpeI</i> de isolados de <i>M. massiliense</i> provenientes de um surto em Curitiba. M, cepa de referência de <i>S. aureus</i> NCTC 8325 usada como marcador de tamanho molecular; posição 1, CRM-587; posição 2, CRM-591; posição 3, CRM-592; posição 4, CRM-593; posição 5, CRM- 595.....	67
FIGURA 5 - PFGE utilizando as enzimas <i>AseI</i> de isolados de <i>M. massiliense</i> provenientes de um surto em Curitiba. M, cepa de referência de <i>S. aureus</i> NCTC 8325 usada como marcador de tamanho	

molecular; posição 1, CRM-020; posição 2, CRM-591; posição 3, CRM-592; posição 4, CRM-593.....68

FIGURA 6 – PFGE utilizando as enzimas *Xba*I de isolados de *M. massiliense* provenientes de um surto em Curitiba. M, cepa de referência de *S. aureus* NCTC 8325 usada como marcador de tamanho molecular; posição 1, CRM-020, posição 2, CRM-591, posição 3, CRM-592, posição 4, CRM-593.....68

FIGURA 7 - Dendrograma referente aos padrões de PFGE em isolados *M. massiliense*. A comparação foi feita utilizando o GelCompar software (Applied Maths). O coeficiente de Dice foi utilizado para calcular as percentagens de similaridade entre os perfis. Os padrões de PFGE do *M. massiliense* isolado no surto do Rio de Janeiro (CRM 0020) e duas cepas epidemiologicamente independentes de pacientes provenientes do Rio de Janeiro (CRM 0270 e CRM 0273) foram incluídos na análise. ^a Hn, isolado obtido de paciente submetido à cirurgia no hospital ⁿ ^b RJ, isolado recuperado do Rio de Janeiro.....69

FIGURA 8 - Sequenciamento da região QRDR (120 pb) do gene *gyrA* nos 36 isolados de *M. massiliense*.....70

FIGURA 9 - Sequência de aminoácidos, deduzida a partir da sequência de nucleotídeos, da região QRDR do gene <i>gyrA</i> nos 36 isolados de <i>M. massiliense</i>	71
FIGURA 10 - Sequenciamento da região QRDR (116 pb) do gene <i>gyrB</i> nos 36 isolados de <i>M. massiliense</i>	71
FIGURA 11 - Sequência de aminoácidos, deduzida a partir da sequência de nucleotídeos, da região QRDR do gene <i>gyrB</i> nos 36 isolados de <i>M. massiliense</i>	72
FIGURA 12 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene <i>tap</i> construída pelo método de neighbor-joining. Os valores de <i>bootstrap</i> (<i>bootstrap</i> : 1000) são apresentados nos ramos da árvore.....	76
FIGURA 13 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene <i>lfrA</i> construída pelo método de neighbor-joining. Os valores de <i>bootstrap</i> (<i>bootstrap</i> : 1000) são apresentados nos ramos da árvore.....	77
FIGURA 14 - Mapa com os casos confirmados de infecções por micobactérias de crescimento rápido, no período de 2001-2008 segundo dados fornecidos pela ANVISA.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação das espécies de MNT de acordo com o potencial patogênico.....	22
TABELA 2 - Classificação das micobactérias de crescimento rápido conforme os grupos.....	23
TABELA 3 – Espécies ou grupos de MCR e as infecções mais frequentemente relacionadas.....	28
TABELA 4 – Concentração dos antimicrobianos indicados pelo CLSI para teste de suscetibilidade pela técnica de microdiluição em caldo.....	31
TABELA 5 - Atividade antimicrobiana para as três espécies mais isoladas de micobactérias de crescimento rápido.....	48
TABELA 6 - Número de bandas formadas na análise de PFGE com as enzimas de restrição <i>DraI</i> , <i>SpeI</i> , <i>Asel</i> e <i>XbaI</i>	59
TABELA 7 - Dados (sexo, idade, tipo de cirurgia, data e hospital) dos pacientes envolvidos no surto causado por micobactérias de crescimento rápido em Curitiba, Paraná.....	63

TABELA 8 – Perfil de susceptibilidade dos 36 isolados de <i>M. massiliense</i> frente aos antimicrobianos testados.....	65
TABELA 9 – Mutações em <i>gyrA</i> , CIM e perfil de susceptibilidade dos 36 isolados de <i>M. massiliense</i>	73
TABELA 10 - Relação entre o perfil de susceptibilidade à doxiciclina e ciprofloxacina e a presença dos genes <i>tap</i> e <i>lfrA</i> em isolados de micobactérias de crescimento rápido.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alanina
AMK	Amicacina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
ATCC	American Type Culture Collection
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLR	Claritromicina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DOX	Doxiciclina
FOX	Cefalexina
Gly	Glicina
HIV	Human Immunodeficiency Virus
<i>hsp65</i>	65-kDa heat shock protein gene
IFN	Interferon gama
IL	Interleucina
MAC	Complexo Mycobacterium avium
mL	Mililitros
SLF	Sulfametoxazol
Thr	Treonina
TOB	Tobramicina
Val	Valina

RESUMO

Micobactérias de crescimento rápido (MCR) estão envolvidas em diversos relatos de infecções cirúrgicas como mamoplastia, tratamentos estéticos e bacteremia associada à laparoscopia. Também tem sido associadas a surtos e pseudo-surtos de infecção hospitalar. Dentre os fatores citados como predisponentes a estes surtos destaca-se a facilidade destes micro-organismos crescerem em água destilada, a resistência a solução de glutaraldeído e a capacidade de formar biofilmes. Esta tese apresenta um trabalho de caracterização molecular e investigação epidemiológica, e dois trabalhos relacionados à resistência a antimicrobianos. No primeiro trabalho, 39 casos de infecções cirúrgicas foram estudados; os isolados foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene *rpoB*, perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e análise molecular pela técnica de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Trinta e seis isolados foram identificados como *Mycobacterium massiliense* e os outros três como *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*. PFGE agrupou os 36 isolados de *M. massiliense* e mostrou o mesmo padrão (BRA 100) observado em outros três surtos previamente reportados no Brasil, sugerindo assim uma fonte comum de infecção para todos os pacientes e a disseminação da cepa nos hospitais brasileiros. No segundo trabalho, 35 isolados resistentes à ciprofloxacina foram estudados quanto a presença de mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* e sua relação com a resistência à ciprofloxacina. No total, 31 isolados apresentaram uma substituição no códon 90 (Ala-90→Val) e nenhum isolado apresentou mutação na posição Asp-94. No entanto, 4 isolados resistentes à ciprofloxacina e um

isolado sensível não apresentaram mutações em Ala-90 e Asp-94. Nenhuma mutação no gene *gyrB* foi observada em nossos isolados de *M. massiliense*. O terceiro trabalho avaliou a presença das bombas de efluxo LfrA e Tap em 81 isolados clínicos de MCR (*M. massiliense*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*) e sua relação com a resistência à ciprofloxacina e doxiciclina, respectivamente. Uma relação estatística significativa (Teste exato de Fisher, $P < 0.05$) foi mostrada entre a presença das bombas de efluxo estudadas e a resistência às quinolonas e tetraciclina.

Palavras-Chave: MCR, quinolonas, resistência

ABSTRACT

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are associated with human infections after cosmetic procedures, surgery and post-injection. Also has been involved in outbreaks and pseudo-outbreaks. Predisponent factors include ability to develop in distilled water, glutaraldehyde resistance and capacity to develop biofilm. This thesis presents a study on molecular characterization and epidemiological investigation, and two studies in antimicrobial resistance. In the first study, 39 cases of postsurgical infections were studied; all isolates were submitted to *rpoB* partial gene sequencing for identification, evaluated for their susceptibility to antimicrobial agents and molecular analysis by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). PFGE clustered all 36 *M. massiliense* isolates and showed the same pattern (BRA 100) observed in three other outbreaks previously reported in Brazil, suggesting a common source of infection for all patients and reinforcing the hypotheses of spread of *M. massiliense* BRA100 in Brazilian hospital surgical environment in the recent years. In the second study, was investigated a total of 36 *Mycobacterium massiliense* clinical isolates for their susceptibility to ciprofloxacin and presence of *gyrA* and *gyrB* genes mutations. A total of 31 ciprofloxacin-resistant isolates presented an amino acid substitution at codon 90 (Ala-90→Val) and no isolate presented mutation at position Asp-94. Moreover, 4 ciprofloxacin-resistant and one susceptible isolate had no mutation in Ala-90 and Asp-94. No *gyrB* mutation was observed in all tested *M. massiliense* isolates. The third study evaluated the presence of LfrA and Tap efflux pumps among clinical isolates of RGM (*M. massiliense*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*) and the correlation with their susceptibility to ciprofloxacin and doxycycline, respectively. The result obtained

with 81 clinical isolates included in the study showed a significant correlation (Fisher's exact test, $P = 0.055$) between the presence of the efflux pumps and resistance to quinolones or tetracycline.

Key-Words: RGM, quinolone, resistance

1. INTRODUÇÃO

Surtos hospitalares e casos isolados de infecções por MCR têm sido reportados em diferentes cenários envolvendo principalmente infecções cirúrgicas. Surtos e pseudo-surtos associados com estes microorganismos têm sido geralmente relacionados a equipamentos médico, soluções e reagentes laboratoriais contaminados. No Brasil, os primeiros surtos causados por espécies de MCR foram relacionados à cirurgia ocular, sessões de mesoterapia e cirurgia de implantes mamários. *M. massiliense* tem sido descrito como o principal agente isolado durante surtos recentes de infecção por MCR em vários estados brasileiros.

A presente tese de doutorado faz parte de projeto intitulado “Caracterização molecular de isolados coletados de um surto no Estado do Paraná”, aprovado junto à Secretaria de Saúde do estado do Paraná e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Hospital do Trabalhador sob o número 244690.

O referido projeto objetivou implantar no LACEN-PR a identificação de isolados clínicos de MCR coletadas em todo o estado. Este estudo foi desenvolvido no Setor de Biologia Molecular do LACEN-PR e no Laboratório de Micobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Durante o período do estudo, foram avaliados os casos envolvidos corrido na idade de Curitiba e isolados não relacionados ao surto.

Pretende-se, com a análise, discussão e divulgação científica dos resultados dessa tese, facilitar o tratamento dos pacientes, controlar novos surtos e evitar a resistência bacteriana aos antimicrobianos atualmente utilizados no tratamento destas infecções.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Caracterizar isolados de micobactérias de crescimento rápido coletados no Paraná e correlacionar o perfil de susceptibilidade destes isolados com mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* e a presença de bombas de efluxo Tap e LfrA.

Objetivos Específicos

- Identificar cepas de micobactérias de crescimento rápido isoladas de um surto de infecções cirúrgica ocorrido em Curitiba;
- Verificar a clonalidade dos isolados utilizando-se a técnica de PFGE (*Pulsed-fields gel eletrophoresis*);
- Determinar o perfil de susceptibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos escolhidos;
- Analisar o mecanismo de resistência à ciprofloxacina conferido pelos genes *gyrA* e *gyrB*.
- Correlacionar a presença de bombas de efluxo Tap e LfrA com o perfil de susceptibilidade à doxiciclina e ciprofloxacina, respectivamente.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 INTRODUÇÃO GERAL SOBRE MICOBACTÉRIAS

O gênero *Mycobacterium* é caracterizado por bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), aeróbios, imóveis, não esporulados e não encapsulados (MATTHIAS, 1988). Uma das principais características que difere as micobactérias de outros procariotos é o elevado teor de lipídeos em sua parede celular, organizada em quatro camadas. A camada mais interna é formada por peptídeoglicanos, composta principalmente por ácido N-glicorilmurâmico, e confere rigidez às micobactérias. A próxima camada é formada por arabinogalactano, que se liga às cadeias de ácido micólico presentes na terceira camada (RASTOGI, 2001). O ácido micólico representa 60% da parede celular e sua presença torna estes micro-organismos resistentes à dessecação e dificulta a passagem de agentes antimicrobianos através da parede (PRIMM *et al.*, 2004). Na camada mais externa encontra-se uma variedade de lipídeos como os glicolipídeos, sulfolipídeos, fenolglicolipídeos e peptideoglicolipídeos. A presença de lipídeos complexos na parede celular de micobactérias está relacionada à álcool-ácido resistência, patogenicidade e pode explicar parcialmente a resistência destes micro-organismos a agentes químicos e físicos (RASTOGI, 2001). Adicionalmente, a lenta entrada de nutrientes através desta camada é um dos fatores responsáveis pelo crescimento lento da maioria das espécies (RASTOGI, 2001).

M. tuberculosis e *M. leprae*, agentes causadores da tuberculose e hanseníase, respectivamente, são espécies importantes do gênero *Mycobacterium*. O *M. tuberculosis* faz parte do complexo *M. tuberculosis* (CMTB),

que inclui outras espécies patogênicas ao homem como, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. cannetti*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnepedi*. Existe ainda o complexo *M. avium* (MAC), que inclui espécies como o *M. avium* e o *M. intracellulare*, micro-organismos geralmente associados à complicações em pacientes HIV positivo (MATTHIAS, 1988). As micobactérias não causadoras de tuberculose encontram-se amplamente distribuídas no meio ambiente e nos últimos 20 anos, infecções causadas por estes micro-organismos tornaram-se relativamente mais frequente, relacionada ou não com quadros de imunodepressão (GOMEZ, 2009).

O diagnóstico de infecções por micobactérias é baseado em testes fenotípicos (tempo de crescimento, produção ou não de pigmentos e provas bioquímicas) e testes moleculares (PCR, restrição enzimática e sequenciamento) (TORTOLI, 2003). Em algumas situações, como descrito a seguir, a identificação destes micro-organismos torna-se difícil devido à similaridade encontrada entre elas.

3.2 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO

Micobactérias são micro-organismos taxonomicamente classificados na ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. A definição taxonômica do gênero *Mycobacterium* baseia-se em três critérios: a álcool-ácido resistência (utilizada como princípio da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen), a sequência de guanina-citosina do seu DNA e a síntese de ácido micólico. A análise da composição do ácido micólico é um elemento essencial para a caracterização das espécies de micobactérias. Outros lipídios complexos, como ácidos graxos

de cadeia curta, também atuam como marcadores da caracterização bacteriana (LEVY-FRÉBAUT e PORTALES, 1992).

Micobactérias podem ser classificadas associando-se fatores como, a velocidade de crescimento e a produção de pigmentos, segundo critérios estabelecidos por Runyon (1959). Grupo I de Runyon (fotocromogênicas) – Produz pigmentos (amarelo ou laranja) somente após a exposição à luz (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. genavense*, *M. asiaticum*); Grupo II de Runyon (escotocromogênicas) – Produz pigmento (amarelo ou laranja) no escuro ou no claro (*M. srofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. flavescens*); Grupo III de Runyon (não-fotocromogênicas) – Não produz pigmento em qualquer situação (complexo *M. avium-intracellulare*, *M. paratuberculosis*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. shimoidae*); Grupo IV de Runyon – engloba todas as micobactérias de crescimento rápido com ausência ou aparecimento tardio de pigmentação (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. thermoresistibile*).

3.3 MICOBACTÉRIAS NÃO – TUBERCULOSAS (MNT)

A *American Thoracic Society* utiliza a nomenclatura Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT) para descrever micobactérias não causadoras de tuberculose (JORDAN *et al.*, 2007). MNT têm se destacado como patógenos causadores de infecções oportunistas, estando também relacionados à contaminação de reservatórios de água hospitalar, equipamentos médico e sistema hídrico municipal (WALLACE *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 2001). Podem ser classificadas em potencialmente patogênicas e não patogênicas, conforme sua capacidade de causar doença no homem e animais (tabela 1) (DAVIDSON, 1989).

Tabela 1 - Classificação das espécies de MNT de acordo com o potencial patogênico.

<i>MNT potencialmente patogênicas</i>	<i>MNT raramente patogênicas</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. agri</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. aurum</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. branderi</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. duvalli</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. fallax</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. flavescens</i>
<i>M. genavense</i>	<i>M. gastri</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. gordonae</i>
<i>M. immunogenum</i>	<i>M. hassiacum</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. mageritense</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. neoaurum</i>
<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
<i>M. malmoense</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. porcinum</i>
<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. pulveris</i>
<i>M. peregrinum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. shimoidei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. szulgai</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. ulcerans</i>	<i>M. chitae</i>
<i>M. xenopi</i>	

Fonte: Leão et al, 2004.

A *American Thoracic Society* estabelece dois critérios para determinar o significado clínico das MNT, já que várias espécies fazem parte da microbiota normal transitória do trato respiratório humano: I. Três amostras de escarro ou lavado brônquico com cultura positiva para MNT e pesquisa de BAAR negativa; II. Duas amostras de escarro ou lavado brônquico com cultura positiva e uma pesquisa de BAAR positiva. Um caso clínico sem significado é considerado aquele com uma única cultura positiva e com pesquisa de BAAR negativa ou com baixo número de bacilos (WOODS, 2000).

MNT podem ser classificadas em dois grandes grupos, baseado no tempo de crescimento em meio de cultura I. MNT de crescimento lento (MCL) II. MNT de crescimento rápido (MCR). Espécies potencialmente patogênicas de MCL estão geralmente associadas à infecções disseminadas, principalmente em pacientes HIV positivo (BARRETO *et al.*, 1993). Por outro lado, as infecções pós-traumáticas e localizadas geralmente são causadas por espécies de MCR (FREITAS *et al.*, 2003; WINTHROP *et al.*, 2003).

Devido à grande similaridade entre as espécies de MCR capazes de causar doenças em humanos, estas são classificadas em três grupos, baseado I. Na presença de ácido micólico na parede celular II. No aparecimento de colônias visíveis em meio sólido em um período de sete dias e III. Ausência ou aparecimento tardio de pigmentação. Estes grupos são denominados: Grupo do *Mycobacterium fortuitum*, Grupo do *Mycobacterium chelonae/abscessus* e Grupo do *Mycobacterium smegmatis* (tabela 2) (BROWN- ELLIOTT e WALLACE, 2002).

Tabela 2 - Classificação das micobactérias de crescimento rápido conforme os grupos.

Grupo <i>M. fortuitum</i>	Grupo <i>M. chelonae/abscessus</i>	Grupo <i>M. smegmatis</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. peregrinum</i> tipo 1	<i>M. abscessus</i>	<i>M. wolinskyi</i>
<i>M. peregrinum</i> tipo 2	<i>M. immunogenum</i>	<i>M. goodii</i>
<i>M. houstonense</i>	<i>M. massiliense</i>	
<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. bolletii</i>	

Fonte: Brown-Elliott e Wallace (2002)

Dentre as MCR pertencentes ao grupo *M. chelonae/abscessus* destaca-se o *M. massiliense*, que foi recentemente renomeado como *M. abscessus* subsp. *bolletii* (LEÃO *et al.*, 2011). Devido aos artigos deste estudo já estarem publicados, adotaremos nesta tese a sua nomenclatura anterior - *M. massiliense*.

3.4 INTERAÇÕES COM O HOSPEDEIRO E O AMBIENTE

3.4.1 Aspectos imunológicos

O conhecimento sobre os mecanismos de patogenicidade das MCR é limitado, mas devido à semelhança com o *M. tuberculosis*, autores acreditam que estas espécies dividem os mesmos mecanismos, entre eles a habilidade de crescer no interior de macrófagos (KAWAMURA, 2008).

Após a fagocitose das micobactérias, inicia-se dentro do citoplasma do macrófago, um mecanismo de fusão do fagossoma contendo o micro-organismo com um lisossoma repleto de substâncias lesivas. O fagolisossoma formado permanece ligado ao micro-organismo por meio de receptores de complemento e do receptor de manose. Dentro do fagolisossoma, o micro-organismo sofre a ação do pH ácido, de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e de nitrogênio (RNIs), de enzimas lisossômicas e de peptídeos tóxicos. Aparentemente, os RNIs são a arma mais potente do macrófago contra as bactérias virulentas. Porém, as micobactérias são dotadas de mecanismos para sobreviver à fusão dos fagolisossomas. A glicoproteína lipoarabinoman (LAM) presente na superfície da micobactéria, é capaz de mediar a interação com os receptores de manose, inibindo a ação de compostos intermediários de formas reativas do oxigênio e diminuindo a produção de citocinas inflamatórias (STURGILLI-KOSZICKY *et al.*, 1994). Adicionalmente, as estratégias utilizadas

pelas micobactérias incluem também a inibição do processo de fusão, a inativação das enzimas lisossômicas e modificações no fagolisossoma, que facilitam a sobrevivência e replicação (KAWAMURA, 2008). Há indícios de que os mecanismos imunes e de sobrevivência envolvam a disputa pelo ferro, essencial tanto para a sobrevivência celular como para os mecanismos de defesa do hospedeiro. Como resultado da ação desses mecanismos, parte das micobactérias serão destruídas dentro dos fagolisossomas e outra parte será capaz de sobreviver e mesmo multiplicar-se dentro dos macrófagos (STURGILLI-KOSZICKY *et al.*, 1994). Se o micro-organismo consegue sobreviver a esta etapa dentro do hospedeiro, ele pode induzir a uma resposta imune mediada por linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ (THOMSEN *et al.*, 1995).

A resposta imune produz alguns componentes envolvidos no controle das infecções, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12) (COOPER *et al.*, 1993; COOPER *et al.*, 2002). Provavelmente o componente imunomodulador mais importante para o controle da infecção é o IFN- γ , produzido pelas células NK (*Natural Killer Cell*) e pelos macrófagos infectados, diferente da IL-4 e IL-10 que modulam negativamente a resposta inflamatória, sendo considerados fatores permissivos para a proliferação intracelular destes micro-organismos (STURGILLI-KOSZICKY *et al.*, 1994; FLYNN e CHAN, 2001).

3.4.2 Fatores de virulência

A morfologia das colônias, relacionada com a presença de glicopeptídeo-lipídeos (GLPs) na parede celular (ETIENNE *et al.*, 2002), apresenta uma relação direta com a virulência das micobactérias.

Pesquisadores analisaram cepas lisas e rugosas de *M. abscessus* e concluíram que as cepas rugosas estimulavam mais a produção de TNF- α quando comparadas com as colônias lisas. Por outro lado, a parede celular das colônias lisas apresenta uma maior quantidade de GLPs (CATHERINOT *et al.*, 2007). Algumas espécies, como *M. abscessus*, possui a capacidade de modificar a morfologia das colônias entre lisa e rugosa, promovendo a mudança para um fenótipo mais virulento; este fato ocorre pelo aumento ou diminuição na expressão de GLPs (HOWARD *et al.*, 2006).

Acredita-se que a presença de lipídeos na parede celular das micobactérias também favoreça o processo infeccioso por atuar como um elemento de proteção durante a fagocitose (BROWN-ELLIOT e WALLACE, 2002; BROWN-ELLIOT *et al.*, 2002).

3.4.3 Formação de Biofilmes

Biofilmes microbianos são definidos como comunidades complexas formadas por micro-organismos aderidos à superfícies sólidas ou semi-sólidas envolvidas por uma matriz de polissacarídeos. A organização dos micro-organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao desenvolvimento e permite a sobrevivência em ambientes hostis. Biofilmes têm a capacidade de formar-se em qualquer superfície úmida, sendo ela biótica ou abiótica (DAVEY e O'TOOLE, 2002).

Vários fatores estão relacionados ao desenvolvimento de um biofilme, tais como: temperatura, presença de agentes antimicrobianos, forças hidrodinâmicas, características do substrato, variação de pH, quantidade disponível de nutrientes e oxigênio, assim como as concentrações dos metabólitos microbianos (NAVES *et al.*, 2008).

M. fortuitum e *M. chelonae* foram encontrados fazendo parte de biofilmes em diversos sistemas hídricos. Além disso, várias espécies de MCR foram capazes de formar biofilmes *in vitro*, sendo a composição química do meio um fator influente no tempo despendido para a formação (ESTEBAN *et al.*, 2008).

Com base em diversos estudos (WALLACE *et al.*, 1989; HALL-STOODLEY e LAPPIN-SCOTT, 1998), autores sugerem que biofilmes devem ser considerados possíveis reservatórios para a sobrevivência de micobactérias oportunistas em ambientes aquáticos. Como os micro-organismos geralmente estão aderidos ao material da tubulação, muitas vezes torna-se difícil a identificação destes na água (WALLACE *et al.*, 1989).

3.5 INFECÇÕES POR MCR

MCR podem causar uma ampla variedade de infecções (tabela 3) e por sua resistência a desinfetantes conseguem sobreviver no ambiente hospitalar, sendo responsáveis pela ocorrência de surtos (WALLACE *et al.*, 1998). Por estarem no meio ambiente é difícil distinguir entre contaminação e doença, quando os isolados são obtidos de amostras clínicas (CULLEN *et al.*, 2000).

Tabela 3 – Espécies ou grupos de MCR e as infecções mais frequentemente relacionadas.

<i>Espécie</i>	<i>Tipos de infecções</i>	
	<u>Pacientes imunocompetentes</u>	<u>Pacientes imunossuprimidos</u>
<i>M. fortuitum</i>	Infecção localizada pós-traumática Infecção em feridas cirúrgicas, principalmente após cirurgias cardíacas	Infecção por cateter
<i>M. chelonae</i>	Infecção localizada pós-traumática Infecção na córnea após trauma ou cirurgia	Infecção disseminada na pele de pacientes recebendo corticosteróide Infecção por cateter
<i>M. abscessus</i>	Infecção pulmonar crônica Infecção localizada pós-traumática Otite média crônica Osteomielite seguida de fratura aberta Infecção pulmonar	Infecção disseminada na pele de pacientes recebendo corticosteróide Infecção por cateter
<i>M. mucogenicum</i>	Contaminante de escarro	Infecção por cateter
<i>M. bolleti</i>	Infecção localizada pós-traumática Osteomielite seguida de fratura aberta Infecção em feridas cirúrgicas	Infecção por cateter

Fonte: Brown-Elliott e Wallace (2002)

Estudos indicam um aumento no número de casos de infecções por MCR tanto em pacientes imunocomprometidos como em imunocompetentes (YATES *et al.*, 1997). As espécies patogênicas causam vários tipos de

infecções, desde abscessos localizados até infecções disseminadas (FALKINHAM, 1996), provocando a infecção pela entrada do cimro-organismo durante procedimentos invasivos. Um dos primeiros relatos de infecção por MCR foi relacionado a um implante de dispositivo anticoncepcional, resultando na formação de abscesso no sítio de aplicação (ALFA *et al.*, 1995). Infecção da pele, caracterizada por progressiva inflamação granulomatosa, já foi relatada devido à lipoaspiração (MEYERS *et al.*, 2002), mesoterapia (VIANA-NIERO *et al.*, 2008) e mastite após o uso de *body piercing* (TRUPIANO *et al.*, 2001). MCR também são responsáveis por septicemia ou doença pulmonar seguida de broncoscopia (ANALSSIE, 2002), osteomielite, artrite, linfadenite, otite média crônica e infecção de córnea (WRIGHT e WALLACE, 1995).

M. massiliense surgiu como um patógeno emergente e está envolvido em diversos relatos de infecções pós-cirúrgicas como mamoplastia, lipoaspiração, tratamentos estéticos, injeções intramusculares, ceratite após cirurgia a laser e bacteremia associada à laparoscopia (WALLACE *et al.*, 1998; BROWN-ELLIOTT, 2002; FREITAS *et al.*, 2003; TIWARI *et al.*, 2003; USLAN *et al.*, 2006; EID *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; CARBONNE *et al.*, 2009). Também tem sido associado a surtos e pseudo-surtos de infecção hospitalar (CARDOSO *et al.*, 2008; VIANA-NIERO *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2009). Dentre os fatores citados como predisponentes a estes surtos destaca-se a facilidade deste cimro-organismo crescer em água destilada, a resistência a glutaraldeído e a capacidade de formar biofilmes (WALLACE *et al.*, 1998; ADÉKAMBI *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2009).

3.6 TRATAMENTO DAS INFECÇÕES

A identificação do cimro-organismo nas infecções causadas por MCR é um ponto muito importante para a definição da terapia antimicrobiana (GALIL *et al.*, 1999). O uso de uma única droga para infecções localizadas devido a MCR é geralmente suficiente, com risco mínimo de desenvolver resistência antimicrobiana. Em contraste, infecções cutâneas com formação de abscessos e doenças pulmonares usualmente requerem o uso combinado de antimicrobianos, incluindo medicação oral e endovenosa (BROWN-ELLIOTT e WALLACE, 2002).

Antimicrobianos de primeira linha utilizados no tratamento de infecções por *M. tuberculosis* como rifampicina, etambuto e isoniazida não são ativos e não devem ser indicados em caso de infecções por MCR (PRING *et al.*, 1996; EID *et al.*, 2007).

Uma lesão infectada por MCR dificilmente apresenta melhora espontânea, mesmo após o debridamento cirúrgico. Relata-se que em alguns casos de infecção por espécies do grupo *M. chelonae/abscessus* somente o tratamento cirúrgico foi suficiente (WALLACE *et al.*, 2003). Porém, os mesmos autores reportaram que somente a cirurgia para lesões mais sérias, sem terapia antimicrobiana, foi suficiente para a cura, porém a recidiva ocorreu dentro de quatro a seis semanas após a cirurgia. Por outro lado, excisões cirúrgicas e/ou debridamento de lesões em combinação com terapia antimicrobiana apropriada resultam em cura sem recidiva (WALLACE *et al.*, 1991). A tabela 5 mostra a atividade antimicrobiana das principais drogas preconizados em casos de infecções pelas MCR mais frequentemente encontradas.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana para as três espécies mais isoladas de micobactérias de crescimento rápido.

<i>Espécies/Grupo</i>	<i>Agente antimicrobiano</i>	
	>90% susceptível ou intermediário	<90% susceptível ou intermediário
Grupo <i>M. fortuitum</i>	Amicacina, cefoxitina, ciprofloxacina, gatifloxacina, imipenem, linezolida, levofloxacina, sulfametoxazol ou trimetoprim-sulfametoxazol (96%)	Claritromicina (80%) Doxiciclina (46%) Vancomicina (38%)
<i>M. abscessus</i>	Amicacina (98%), cefoxitina (95%), Claritromicina	Ciprofloxacina (<1%), doxiciclina (4%), imipenem (57%), linezolida (48%)
<i>M. chelonae</i>	Amicacina (97%), claritromicina, linezolida (94%), gatifloxacina (96%), tobramicina	Ciprofloxacina (19%), doxiciclina (26%), imipenem (40%)

Fonte: Brown-Elliott e Wallace (2002)

Muitos autores consideram a claritromicina como a droga de escolha para o tratamento das infecções causadas por espécies do grupo *M. chelonae/abscessus* (TRUPIANO *et al.*, 2001). Um estudo mostrou que pacientes com quadro infeccioso causado por *M. massiliense* evoluíram para a cura sem relato de recidiva, após tratamento com claritromicina (KIM *et al.*, 2007). Porém, é aconselhável a combinação de antimicrobianos no tratamento destas infecções, especialmente pela associação da claritromicina com amicacina, canamicina, imipenem ou cefoxitina. Além disso, recomenda-se que os pacientes sejam submetidos ao tratamento por um período mínimo de três meses (SCHOLZE *et al.*, 2005; RYU *et al.*, 2005).

Alguns casos de infecção por espécies do grupo *M. chelonae/abscessus* não apresentaram uma resposta adequada ao tratamento com macrolídeos

(especialmente a claritromicina), mesmo apresentando susceptibilidade *in vitro* (NASH *et al.*, 2009). Isto ocorre porque determinados isolados podem desenvolver resistência induzível aos macrolídeos. A resistência induzível é provocada pelo gene *erm* (41), que confere resistência a claritromicina e eritromicina. A exposição destes isolados a macrolídeos, estreptogaminas ou lincosaminas eleva os níveis de expressão do gene *erm* (41) em 24 horas, o que poderia explicar a falha no tratamento monoterápico com macrolídeos.

A Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA) em nota técnica número 03/07 de 28 de dezembro de 2007, preconizou o seguinte tratamento para a ocorrência de casos de infecções por MCR após videocirurgia; a) Uma etapa inicial, consistindo de ressecção cirúrgica das lesões, com prévia exploração por propedêutica armada da parede da cavidade, se esta foi acessada durante o procedimento prévio; b) Uma segunda etapa de poliquimioterapia por seis meses, com claritromicina (500mg, 12/12h), terizidona (500mg/dia) e amicacina (1,0g IV, 3 vezes/semana). A SESA segue um esquema baseado na orientação recebida do Centro de Referência Professor Hélio Fraga em 27/12/2007.

3.7 RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

O uso de antimicrobianos revolucionou a abordagem das infecções e o seu sucesso gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, a prescrição nem sempre criteriosa ou racional desses antimicrobianos, rapidamente gerou dificuldades para seu uso, devido à progressiva resistência bacteriana a certas drogas (MONTELLI e SADATSUNE, 2001).

A resistência a agentes antimicrobianos não é um fenômeno recente. Por exemplo, a identificação das β -lactamases, enzimas envolvidas no mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos, ocorreu inícios dos anos 40, antes do uso generalizado da penicilina no mundo todo (ABRAAM e CHAIN, 1940).

A resistência bacteriana pode ser uma característica intrínseca (resistência primária ou natural) de um organismo, como resultado de mutações espontâneas ou aquisição de genes de resistência exógenos presentes em elementos transponíveis (HOGAN e KOLTER, 2002; NORMARK e NORMARK, 2002). Se uma espécie bacteriana apresenta resistência intrínseca, assim cada membro correspondente da espécie é resistente na ausência de alguma alteração genética. Como por exemplo, os micoplasmas que são resistentes aos beta-lactâmicos devido à ausência de peptidoglicanos na parede celular. Similarmente, muitas espécies de bactérias entéricas são pouco susceptíveis a antimicrobianos hidrofóbicos como os macrolídeos, devido a estas drogas não penetrarem na membrana destes organismos eficientemente (NIKAIDO, 2000).

Sob exposição continuada a antimicrobianos, alguns micro-organismos apresentam resistência adquirida (secundária), decorrente do desenvolvimento de mecanismos de defesa (FUCHS e WANNMACHER, 1999). Alguns micro-organismos podem adquirir mutações genéticas aleatoriamente ou sofrer mudanças na permeabilidade da membrana, fatores que podem resultar em resistência a certos antimicrobianos (JARLIER e NIKAIDO, 1994). Denomina-se resistência simples quando o micro-organismo é resistente a uma só droga

e resistência múltipla, quando simultaneamente a duas ou mais drogas (TAVARES, 2001).

Nos próximos tópicos, abordamos os principais mecanismos de resistência bacteriana as quinolonas e tetraciclina, duas classes de antimicrobianos amplamente utilizadas no tratamento de infecções por MCR.

3.7.1 Quinolonas: mecanismo de ação e atividade antibacteriana

As quinolonas constituem um grupo de antimicrobianos de largo espectro, introduzidas na prática clínica no início dos anos 80. São estruturalmente relacionadas com o ácido nalidíxico, com o qual partilham seu mecanismo de ação farmacológica (DOMAGALA *et al.*, 1986).

A estrutura química das quinolonas (figura 1) apresenta dois anéis quinolônicos, sendo classificadas em diferentes grupos de acordo com a composição química destes anéis. A adição de uma molécula de flúor na posição 6 do duplo anel (fluoroquinolonas) aumenta a especificidade de ligação e facilita a penetração destes agentes na célula bacteriana levando a um aumento na eficácia destes fármacos (DOMAGALA *et al.*, 1986).

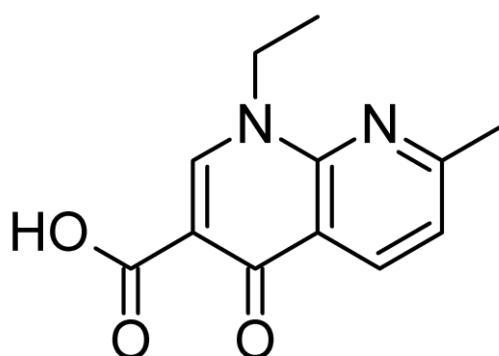


Figura 1 – Estrutura química das quinolonas

O seu espectro de ação abrange micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e *Mycobacterium* spp. (VON ROSENTIEL, 1994). Sua eficácia aliada as excelentes características farmacocinéticas das quinolonas, especialmente a biodisponibilidade e difusão tecidual, explicam o grande uso desta droga no tratamento de processos infecciosos. Porém, o uso aumentado destas drogas tem levado ao surgimento de isolados resistentes a quinolonas (RUIZ, 2003).

In vitro, a ciprofloxacina é a quinolona que apresenta a maior atividade antibacteriana e é, muito provavelmente, a quinolona mais utilizada no meio hospitalar. É considerada uma quinolona de terceira geração, atingindo uma elevada concentração intra e extracelular na maioria dos tecidos. Além disso, apresenta boa atividade contra MCL e MCR, podendo ser utilizada em esquemas de primeira e segunda linha contra estes agentes (COOPER e LAWLOR, 1989) .

As quinolonas agem inibindo a DNA girase e impedindo o processo de replicação do DNA bacteriano. Neste processo, o DNA começa a ser duplicado com a montagem da maquinaria enzimática de replicação no sítio de iniciação do DNA, e prossegue em sentido bidirecional até que as forquilhas de replicação se encontrem no lado oposto da molécula circular. A enzima DNA-helicase desenrola a dupla fita de DNA antes da atuação da DNA-polimerase, promovendo assim a continuação da replicação. No entanto, a ação conjunta dessas enzimas durante o avanço da forquilha de replicação resulta na formação de super-espirais positivas no DNA, que se não for corrigida, pode impedir a replicação (PIDOCCK, 2002). Para solucionar estes problemas, enzimas chamadas topoisomerases agem tornando o processo de replicação mais eficiente (DRLICA e ZHAO, 1997; HOPKINS *et al.*, 2005). Essas enzimas

promovem a introdução de giros super-helicoidais negativos no DNA circular auxiliando no processo de compactação do material genético bacteriano, e também remove giros superhelicoidais positivos à frente da forquilha de replicação do DNA (HOOPER, 2001). Em micobactérias, a principal topoisomerase é a do tipo II, denominada DNA-girase. A enzima consiste de duas proteínas, GyrA e GyrB, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente (CHAMPOUX, 2001).

3.7.2 Mecanismos de resistência às quinolonas

Estudos mostram que a alteração na DNA girase é considerado o principal mecanismo de desenvolvimento da resistência às quinolonas em micobactérias (GUILLEMIN *et al.*, 1998; CHAMPOUX, 2001). A base genética da resistência é principalmente uma mutação pontual na sequência da DNA girase, ocorrendo em uma curta sequência dos genes *gyrA* e *gyrB* chamada de região determinante de resistência à quinolonas (*quinolone resistance determining region* - QRDR) (GUILLEMIN *et al.*, 1998).

Mutações nos genes *gyrA*, encontradas principalmente no códon 90 e 94 (numeração usada no sistema para *M. tuberculosis*), têm sido responsáveis por conferir alto nível de resistência às quinolonas em várias espécies bacterianas (CHENG *et al.*, 2004). Mutações em *gyrB*, que ocorrem frequentemente nos códons 495, 516 e 533 são raramente observadas em isolados clínicos de micobactérias (MUSSER, 1995; HUANG *et al.*, 2005).

O aminoácido serina no códon 90 (Ser90) geralmente é substituído por alanina (Ala), valina (Val) ou lisina (Lys), enquanto as substituições do aminoácido aspartato no códon 94 (Asp94) implicam em trocas por asparagina (Asn), glicina (Gly), tirosina (Tyr) ou histidina (His). Cepas que carregam estas

diferentes substituições nos códons 90 e/ou 94 apresentam diferentes níveis de redução de susceptibilidade às quinolonas (CHENG *et al.*, 2004; REGEL *et al.*, 1994; VON GROLL *et al.*, 2009).

Alguns autores sugerem que o mecanismo de resistência em micobactérias, ocorre de forma semelhante ao observado em cepas de *Streptococcus pneumoniae*, no qual a resistência às quinolonas pode ser alcançada em um mecanismo de uma única etapa (JANOIR *et al.*, 1996; TANKOVIC *et al.*, 1996); com uma mutação adicional em *gyrA* levando a um alto nível de resistência (PAN *et al.*, 1996).

3.7.3 Bombas de efluxo e o desenvolvimento de resistência

Além de alterações na região alvo, a resistência bacteriana tem sido associada a um conjunto de outros fatores como, a presença de bombas de efluxo e alterações nas porinas presentes na membrana externa (TAKIFF *et al.*, 1996), as diferenças na permeabilidade celular (JARLIER e NIKAIDO, 1994), e inativação ou modificação da droga (LI e NIKAIDO, 2004).

McMurry *et al.* (1980) forneceu a primeira evidência de que a resistência a antimicrobianos envolve fluxo ativo de moléculas para o exterior da célula. Desde então, mecanismos de efluxo tem sido reconhecido como os maiores envolvidos na resistência bacteriana (NIKAIDO, 1994; LEVY, 2002), sendo uma das maiores preocupações em cepas patogênicas que desenvolveram resistência múltipla às drogas (LEVY, 2002). Anteriormente, a resistência intrínseca foi considerada um mecanismo passivo, devido a ausência de regiões alvo ou pela falta de permeabilidade das bactérias a certas drogas. No entanto, tem se tornado cada vez mais evidente que a resistência intrínseca de

muitas bactérias depende da presença de sistemas de efluxo (LI *et al.*, 1994; NIKAIDO, 2001; RYAN *et al.*, 2001).

Os antimicrobianos podem servir como agentes indutores, interagindo com o sistema de regulação da expressão gênica de proteínas formadoras de bombas de efluxo (ROBERTS, 1996). As bombas de efluxo podem ser também expressas como resultado de mutações nos genes que as codificam (ZGURSKAYA e NIKAIDO, 2000), e podem portanto, representar um importante papel tanto na resistência intrínseca como na resistência adquirida. Por exemplo, a exposição de *Pseudomonas aeruginosa* a quinolonas leva ao desenvolvimento de cepas resistentes com mutações nos genes que codificam para topoisomerasas e bombas de efluxo (OH *et al.*, 2003). As bombas de efluxo, também contribuem para a resistência à quinolonas em *Streptococcus pneumoniae* (BROSKEY *et al.*, 2000), onde 45% dos isolados clínicos são resistentes à ciprofloxacina devido a presença de um conhecido mecanismo de efluxo (BRENWALD *et al.*, 1998).

Algumas bombas de efluxo mostram uma marcada especificidade a substratos, mas muitos transportadores são menos específicos e devolvem para o meio extracelular uma ampla variedade de drogas estruturalmente não relacionadas (NEYFAKH, 2002). Assim, estes transportadores podem bombear para fora da célula uma grande variedade de compostos nocivos, suprimindo as bactérias com um mecanismo ideal para escapar da terapia antimicrobiana convencional (LOMOVSKAYA e WATKINS, 2001).

Bombas de efluxo bacterianas têm sido classificadas em cinco famílias (LI e NIKAIDO, 2004). Duas destas famílias são grandes superfamílias: Superfamília ABC (*ATP-binding cassette*) e a Superfamília de Facilitadores

Principais (MFS). As outras três famílias são menores e formadas mais recentemente: Pequena Resistência a Múltiplas Drogas (SMR), Resistência-Nodulação-Divisão (RND) e Extrusão de Múltiplas Drogas e Compostos Tóxicos (MATE). As proteínas das famílias MFS, SMR, RND e MATE são transportadores secundários no qual o efluxo de drogas é acoplado com o influxo de próton (H^+). Estas bombas são frequentemente referidas como antiporte droga- H^+ . Em contraste, membros da família ABC, que são considerados transportadores primários, fazem uso de ATP como uma fonte de energia para efetuar o efluxo. O genoma do *M. tuberculosis* contém genes que codificam para bombas de efluxo de todas estas famílias.

3.7.4 Bombas de efluxo transportando quinolonas

O mais importante mecanismo de resistência à quinolonas em isolados clínicos de *M. tuberculosis* envolve mutações em *gyrA* (GINSBURG *et al.*, 2003). No entanto, mutações em *gyrA* não são encontradas em uma proporção significativa de isolados resistentes à quinolonas, sugerindo que a resistência pode estar associada a mecanismos de bombas de efluxo.

Em micobactérias, duas bombas de efluxo MFS têm sido associadas com transporte de quinolonas: a bomba de efluxo LfrA, inicialmente isolada do *M. smegmatis* e a bomba de efluxo Rv1634, isolada do *M. tuberculosis*. LfrA foi a primeira bomba de efluxo descrita no gênero *Mycobacterium* e sua síntese leva a um baixo nível de resistência a quinolonas em cepas de *M. smegmatis*. Porém, quando sua expressão está aumentada, sua presença tem um importante papel na resistência a ciprofloxacina (LIU *et al.*, 1996; TAKIFF *et al.*, 1996). Dois possíveis mecanismos podem levar a um aumento do nível de LfrA: mutações levando a expressão constitutiva, ou indução da expressão

desta bomba pelo substrato. A contribuição de LfrA para a resistência a ciprofloxacina em *M. smegmatis* foi estudada construindo-se cepas carregando o gene *lfrA* inativado por uma inserção (SANDER *et al.*, 2000). A inativação do gene *lfrA* diminuiu em duas vezes o valor da concentração inibitória mínima (CIM) da ciprofloxacina; os mesmos resultados foram recentemente confirmados por Li *et al.* (2004).

Quinolonas provavelmente não são o substrato natural de LfrA, alguns autores acreditam que esta bomba estaria envolvida na exportação de agentes ambientais tóxicos ou metabólitos celulares (NEYFAKH, 1997). Por exemplo, micro-organismos produtores de antibióticos usam bombas de efluxo para exportar rapidamente estes antibióticos, protegendo a célula contra os seus efeitos. Nestes organismos, bombas de efluxo atuam como um mecanismo de proteção e reconhecem os antibióticos como seu substrato natural.

Genes que codificam bombas de efluxo frequentemente fazem parte de um operon, cuja expressão é controlada por uma região reguladora. A expressão excessiva destes genes pode ser deletéria, devido a dano físico ou fisiológico da integridade da membrana ou à cessão da exportação de metabólitos essenciais (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

A análise da sequência da região localizada imediatamente antes (*upstream*) ao gene *lfrA* revelou a presença de uma fase de leitura aberta codificando um polipeptídeo de 195 aminoácidos, LfrR (LI *et al.*, 2004). Tanto o gene *lfrA*, como o gene *lfrR* parecem estar organizados dentro de um operon potencialmente controlado pelo regulador de transcrição, LfrR. Pesquisadores mostraram que, a deleção de *lfrR* aumentou a expressão de *lfrA*, aumentando a

resistência da cepa à ciprofloxacina em 4 a 16 vezes o valor de CIM (LI *et al.*, 2004).

Não existe um homólogo conhecido do gene *lfrA* no genoma de *M. tuberculosis* (DE ROSSI *et al.*, 2002), assim outros mecanismos ou outras bombas de efluxo podem estar envolvidos na resistência a quinolonas nesta espécie. Um estudo da sequência do genoma do *M. tuberculosis*, identificou 16 fases de leitura aberta codificando para bombas de efluxo (DE ROSSI *et al.*, 2002). Uma destas bombas, Rv1634, diminui a susceptibilidade a diversas quinolonas quando expressas em *M. smegmatis*, e dados sugerem que esta bomba pode estar envolvida no efluxo de norfloxacina e ciprofloxacina (DE ROSSI *et al.*, 2002), demonstrando assim a presença de um transportador de quinolonas específico em *M. tuberculosis*. O gene que codifica Rv1634 foi clonado em diferentes vetores, e aumentou o valor da CIM à ciprofloxacina em duas a quatro vezes em cepas de *M. smegmatis*. Rv1634 também diminuiu a susceptibilidade à ciprofloxacina em oito vezes em cepas de *M. bovis* BCG.

Embora um alto nível de resistência a quinolonas seja geralmente associado com mutações em genes que codificam para alvos primários, a resistência pode ser aumentada com a combinação de mutações em regiões alvo e a presença de bombas de efluxo (BUSH e GOLDSCHMIDT, 2000). Independente do mecanismo, quinolonas levam a seleção de mutantes presentes em grandes populações bacterianas, que têm mutações cromossômicas alterando a proteína alvo ou aumentando a expressão das bombas. As quinolonas que reconhecem estes dois alvos moleculares podem ser mais eficazes, reduzindo assim a probabilidade de desenvolver resistência.

3.7.5 Tetraciclina: mecanismo de ação e atividade antibacteriana

As tetraciclina são drogas que possuem diversas propriedades favoráveis, tais como amplo espectro de ação, baixa toxicidade, baixo custo e podem ser, na maioria dos casos, administradas por via oral (SHLAES, 2006; ZHANEL *et al.*, 2004). Devido a essas propriedades, as tetraciclina têm sido utilizadas indiscriminadamente, o que tem levado ao aparecimento de resistência em um grupo variado de bactérias e tem provocado restrições no uso clínico destas drogas (SPEER *et al.*, 1992). No entanto, as tetraciclina ainda são bastante úteis na clínica médica e têm sido usadas no tratamento de diversos tipos de infecções (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

Tetraciclina apresentam um amplo espectro de ação contra numerosos patógenos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. São ativas contra isolados clínicos de várias espécies de MCR, incluindo *M. fortuitum*, *M. smegmatis* e *M. mucogenicum*. No entanto, são menos efetivas em condições clínicas contra outras MCR como, *M. chelonae* e *M. abscessus*. Estudos preliminares têm mostrado que estas espécies contêm diversos determinantes envolvidos na resistência à tetraciclina (PANG *et al.*, 1994; WALLACE *et al.*, 2002). Dentre as tetraciclina, as glicilciclina, minociclina e doxiciclina apresentam maior caráter lipofílico e são mais ativas se comparadas a outras tetraciclina. A estrutura geral das tetraciclina está representada na figura 2.

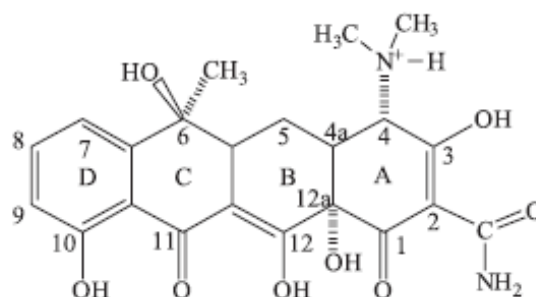


Figura 2 – Estrutura química das tetraciclina

Para exercer sua ação, as tetraciclinas se ligam a subunidade 30S do ribossomo bacteriano impedindo a ligação do aminoacil-t-RNA no sítio A do ribossomo, não ocorrendo assim a adição de aminoácidos e a síntese protéica.

3.7.6 Bombas de efluxo transportando tetraciclinas

Bombas de efluxo relacionadas às tetraciclinas têm sido descritas em muitas espécies bacterianas (ROBERTS, 1996; CHOPRA e ROBERTS, 2001). As duas principais bombas de efluxo relacionadas à tetraciclina em MCR são Tet(V) isolada primeiramente de *M. smegmatis*, e a Tap, isolada de *M. fortuitum*. A expressão da bomba de efluxo Tet(V) em *M. smegmatis* aumentou de 2 a 12 vezes a CIM da glicilciclina, mas não alterou o valor de CIM da doxiciclina e minociclina (DE ROSSI *et al.*, 1998). A sequência do gene *tet(V)*, que codifica Tet(V), apresenta uma pequena similaridade com a sequência de outros genes que codificam transportadores de tetraciclinas em micro-organismos Gram-positivos. Autores investigaram a presença de *tet(V)* em *Mycobacterium* spp., porém *M. smegmatis* e *M. fortuitum* foram as únicas espécies testadas que apresentaram este gene (DE ROSSI *et al.*, 1998).

A bomba de efluxo Tap isolada inicialmente do *M. fortuitum* e seu homólogo, Rv1258c em *M. tuberculosis* (AINSA *et al.*, 1998) conferem resistência a tetraciclinas e aminoglicosídeos, incluindo estreptomicina, a principal droga no tratamento de tuberculose. A síntese de Rv1258c, proveniente de um plasmídeo multicópias, resultou em um aumento de quatro vezes no valor da CIM da tetraciclina e um aumento de oito vezes no valor da CIM da estreptomicina (AINSA *et al.*, 1998). Uma correlação foi recentemente identificada entre a resistência às drogas e a transcrição do gene *tap* Rv1258c do *M. tuberculosis* em um isolado clínico de *M. tuberculosis* resistente à

rifampicina (MIC= 40 mg/mL), ofloxacina (MIC= 4 mg/mL), isoniazida (MIC = 2 mg/mL) e minomicina (MIC = 2 mg/mL) (SIDDIQI et al., 2004). Pela reação de RT-PCR mostrou-se que o nível de transcrição do gene *tap* Rv1258c do *M. tuberculosis* aumentava dez vezes na presença de rifampicina e seis vezes na presença de ofloxacina (AINSA et al., 1998). Estes resultados, sugerem que bombas de efluxo podem ser induzidas em resposta às drogas e estariam possivelmente envolvidas na detoxicação, fato que também poderia ocorrer em outras espécies de micobactérias (FERNANDES et al., 2003).

3.8 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

A discriminação das espécies dentro dos grupos é importante para estudos epidemiológicos, conhecimento da susceptibilidade antimicrobiana e posterior escolha da conduta terapêutica (BROWN-ELLIOTT et al., 2002). Assim, neste tópico abordamos os principais métodos aplicados na identificação de micobactérias.

3.8.1 Identificação Fenotípica

O diagnóstico de infecções causadas por MCR muitas vezes é realizado tardiamente, pois na maioria dos casos suspeita-se de micobactérias após os resultados de testes bacteriológicos convencionais apresentarem resultados negativos (KONEMAN et al., 2001; ANVISA 2004). Além disso, é difícil identificar e diferenciar espécies de micobactérias muito relacionadas por testes fenotípicos e bioquímicos (GOMILA et al., 2007). Além da interpretação dos resultados ser ambígua, estes testes não conseguem distinguir entre algumas espécies como *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. mucogenicum* (CONVILLE e WITEBSKY, 2001).

A baciloscopia é o teste inicial para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em amostras provenientes de casos suspeitos de infecção por micobactérias. Este exame é apenas presuntivo, pois permite a visualização de BAAR presente no material em quantidade igual ou superior a 10^4 bacilos/mL, mas não permite a sua identificação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). É considerado o exame de triagem para a análise do escarro, mas deve-se ter cautela ao avaliar os resultados da baciloscopia em outras amostras devido à presença de micobactérias saprófitas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A cultura é mais sensível que a baciloscopia, pois detecta aproximadamente 10 bacilos/mL (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Dentre vários meios de cultura utilizados para o crescimento de micobactérias, o mais usado na rotina é o meio Lowenstein-Jensen (LJ). A temperatura de incubação para o crescimento ótimo e o tempo de incubação variam com o tipo de amostra clínica. Amostras de tecidos, feridas e úlceras de pele devem ser incubadas à temperatura entre 25°C e 30°C. Para amostras de sangue, medula óssea e amostras respiratórias é preferível uma temperatura de incubação de 37°C (KONEMAN *et al.*, 2001; ANVISA 2004).

O tempo de crescimento, a temperatura ótima de crescimento e a produção de pigmento quando as micobactérias são expostas à luz são fatores que podem auxiliar na diferenciação destes micro-organismos. Com relação ao tempo de crescimento, as MCR desenvolvem-se em até sete dias de incubação, enquanto as MCL podem levar até oito semanas (KONEMAN *et al.*, 2001; ANVISA 2004).

A identificação fenotípica é baseada nas características das cepas testadas em comparação às características de cepas padrão. Os testes são realizados com as células intactas e as condições são críticas para que os resultados sejam confiáveis e reprodutíveis (MARTINS, 2000). Os testes bioquímicos utilizados para diferenciar as espécies do gênero *Mycobacterium* são: acúmulo de niacina; redução de nitratos e nitritos; inibição do ácido p-nitrobenzóico; inibição da hidrazina do ácido tiofeno; inibição da pirazinamida; produção da catalase; produção da urease; crescimento em ágar McConkey sem cristal violeta; redução do telurito; utilização do ferro; hidrólise do Tween 80 e crescimento em NaCl 5% (KONEMAN *et al.*, 2001).

Os testes fenotípicos apresentam a desvantagem de depender do crescimento dos micro-organismos para a sua realização, sendo necessário de 3 a 8 semanas para a obtenção dos resultados (MARTINS, 2000).

3.8.2 Identificação Molecular

Devido a identificação das MCR por testes fenotípicos ser limitada, o uso de técnicas moleculares torna-se imprescindível para um diagnóstico mais rápido e seguro (KONEMAN *et al.*, 2001).

Estudos taxonômicos e filogenéticos de espécies de micobactérias foram por muitos anos baseados na análise do gene 16S rRNA (TORTOLI, 2003). Porém, o princípio proposto para outros micro-organismos, no qual cepas bacterianas pertencem à mesma espécie quando possuem até 15 bases de diferença na sequência do gene 16S rRNA (FOX *et al.*, 1992) não é aplicável para MCR, cujas espécies são mais intimamente relacionadas (HAN *et al.*, 2002).

Um método eficiente na identificação das MCR é denominado de PRA-*hsp65*, baseado na amplificação do gene que codifica a proteína hsp (*heat shock protein*) de 65kDa (TELENTI *et al.*, 1993). Esta técnica utiliza a análise do padrão gerado pela restrição do produto amplificado com as enzimas *BstEII* e *HaeIII*. Pesquisadores analisaram amostras clínicas no intuito de avaliar o potencial da técnica como método de referência e concluíram que a técnica PRA-*hsp65* mostra-se eficiente na identificação de micobactérias de importância médica. É considerada uma técnica rápida, de fácil execução e econômica na identificação de espécies de micobactérias, porém não tem capacidade de diferenciar espécies muito relacionadas (DEVALLOIS *et al.*, 1997; RAMAN *et al.*, 2000). A aplicação desta técnica em um estudo realizado no Rio de Janeiro foi eficaz na identificação de 43 espécies de micobactérias em pacientes com suspeita de infecção por estes micro-organismos (ROCHA *et al.*, 1999). No estado de São Paulo, outro estudo mostrou resultados concordantes entre PRA-*hsp65* e a identificação bioquímica de 76 dos 83 (91,5%) isolados de MCR (SILVA *et al.*, 2001).

Ferramentas moleculares incluindo o sequenciamento de *sodA* (ZOLG e SCHULZ, 1994.), *hsp65* (RINGUET *et al.*, 1999), *dnaJ* (TAKEWASI *et al.*, 1994), *recA* (BLACKWOOD *et al.*, 2000) e *gyrA* (DAUENDORFFER *et al.*, 2003) têm sido propostas para a identificação de isolados clínicos de MCR. Atualmente o gene *rpoB*, gene de cópia simples que codifica a subunidade β da RNA polimerase, tem sido considerado o mais adequado para classificar taxonomicamente as micobactérias (ADÉKAMBI *et al.*, 2006) e reconhecer micobactérias com potencial para doenças invasivas (SIMMON *et al.*, 2007).

3.8.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A microdiluição em caldo é o método recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) como padrão-ouro para a realização de teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para o grupo *M. abscessus/M. chelonae* e grupo *M. fortuitum*. Os agentes antimicrobianos e as concentrações que se recomenda testar em isolados de MCR são apresentados na tabela 4. Os resultados dos testes são obtidos em três a quatro dias e os valores de CIM e a interpretação dos resultados são baseados em tabelas fornecidas pelo CLSI (2003).

Tabela 5 – Concentração dos antimicrobianos indicados pelo CLSI para teste de susceptibilidade pela técnica de microdiluição em caldo.

Agente antimicrobiano	Concentração recomendada (µg/mL)
Amicacina	1 – 128 µg/mL
Cefoxitina	2 – 256 µg/mL
Ciprofloxacina	0,125 – 16 µg/mL
Claritromicina	0,06 – 64 µg/mL
Doxiciclina	0,25 – 32 µg/mL
Imipenem	1 – 64 µg/mL
Sulfametoxazol	1 – 64 µg/mL

Fonte: CLSI (2003)

Outro método bastante utilizado para avaliar a susceptibilidade *in vitro* de MCR é o Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). Este teste consiste em uma tira plástica contendo um gradiente pré-definido de 15 antimicrobianos que serão testados. Um estudo analisou 100 isolados clínicos de MCR quanto à

susceptibilidade à amicacina, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina e imipenem. Neste estudo, os autores concluíram que o Etest pode ser considerado preciso e reprodutível para determinar o perfil de susceptibilidade em isolados de MCR (BIEHLE *et al.*, 1995).

3.9 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Um aspecto importante do uso da epidemiologia molecular no estudo de doenças infecciosas é estabelecer padrões epidemiológicos mais precisos. Assim, com os dados obtidos a partir destes estudos, podemos responder perguntas relacionadas a clonalidade de cepas, estabelecer relações filogenéticas, identificar a origem e rastrear micro-organismos envolvidos em um surto.

Descrevemos neste tópico os principais métodos moleculares utilizados no estudo epidemiológico de micobactérias, bem como suas vantagens e limitações.

3.9.1 *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE)

A técnica de PFGE é utilizada para separar essencialmente cadeias longas de DNA. O genoma completo da bactéria é clivado com enzimas de restrição cujo sítio de corte ocorre de maneira esparsa ao longo do genoma bacteriano. Os fragmentos derivados da digestão são então submetidos a campos elétricos aplicados alternadamente em diferentes direções.

Esta técnica foi aplicada em um estudo envolvendo 311 pacientes suspeitos de infecção por MCR, após procedimentos invasivos realizados na cidade de Belém, Pará (VIANA-NIERO *et al.*, 2008). Do total, 67 isolados foram inicialmente identificados como *M. abscessus* tipo II por PRA-*hsp65* e

posteriormente diferenciados em *M. massiliense* e *M. bolletii* pelo sequenciamento parcial dos genes *rpoB* e *hsp65*. A técnica de PFGE foi capaz de confirmar a relação clonal entre 58 isolados de *M. massiliense* provenientes de pacientes submetidos à laparoscopia. O método também discriminou oito isolados de *M. bolletii*, oriundos de pacientes submetidos à mesoterapia e um isolado de *M. massiliense* que apresentou um padrão diferente dos anteriores. Os autores concluíram que a técnica de PFGE foi primordial para a discriminação de dois surtos concomitantes e um caso de abscesso pós-injeção não relacionado aos surtos.

3.9.2 *Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)*

A técnica de RAPD resulta da utilização de uma sequência iniciadora arbitrária (com cerca de 10 pares de bases), combinada com dois ciclos de PCR de baixa restringência e muitos ciclos de alta restringência. Esta reação, gera um conjunto de produtos de amplificação com diferentes tamanhos e características específicas de um genoma particular. Esta técnica baseia-se no princípio que, a uma temperatura suficientemente baixa, um iniciador pode formar híbridos com muitas sequências, mesmo não sendo estas inteiramente complementares.

Um estudo analisou por RAPD 118 cepas de *M. abscessus* anteriormente analisadas por PFGE (ZHANG *et al.*, 1997). Os resultados obtidos foram concordantes e sugerem que as cepas de *M. abscessus* podem ser avaliadas pelo método de RAPD, em especial aqueles isolados que tiveram seu DNA degradado na técnica de PFGE. Os autores consideraram o método simples, rápido e com um custo relativamente mais baixo quando comparado ao método de PFGE. Porém, enfatizaram que esta é uma técnica útil somente se as

amostras são caracterizadas com no mínimo três *primers* e todos os isolados são processados ao mesmo tempo, para evitar problemas de reprodutibilidade. Apesar da padronização da técnica ter sido considerada difícil, os autores do estudo lembram que o processo de amplificação é extremamente sensível a pequenas diferenças de temperatura de hibridação, podendo resultar em variabilidade nos perfis.

3.9.3 *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)

SDS-PAGE é uma técnica amplamente usada para tipificação epidemiológica de muitos micro-organismos como *Helicobacter pylori*, *Aeromonas hydrophila* e *Moraxella catarrhalis*. No caso das MCR, esta técnica tem sido usada para a caracterização de cepas, e não para estudos epidemiológicos. De acordo com um estudo realizado por Esteban e Cabria (2003), a similaridade intra-espécie foi maior que 95% somente em uma cepa de *M. fortuitum* que apresentava seis bandas de diferença das outras cepas. Embora, a similaridade inter-espécie nestas cepas tenha estado sempre abaixo de 75%, o mesmo perfil foi encontrado entre diferentes cepas da mesma espécie que apresentavam diferentes origens e não possuíam relação entre elas. Devido a estes dados, os autores acreditam que esta não pode ser considerada uma técnica útil para estudos epidemiológicos destes micro-organismos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos gerais e procedimentos microbiológicos

Entre agosto de 2007 e janeiro de 2008, 131 pacientes foram submetidos a procedimentos cirúrgicos, em hospitais particulares localizados na cidade de Curitiba, Paraná. Todos os pacientes apresentaram sinais de infecções pós-cirúrgicas clinicamente sugestivas de MCR, tais como feridas cutâneas, inflamação local, presença de abscesso e ausência de resposta ao tratamento antimicrobiano utilizado comumente em casos de infecções cutâneas. Do total, 39 amostras foram coletadas por biópsia ou aspiração dos abscessos e encaminhadas ao Laboratório Central do Estado do Paraná - LACEN-PR para a investigação microbiológica. As amostras foram cultivadas em meio sólido de Lowenstein-Jensen por até quatro semanas a 37°C (MCMURRAY, 1985).

Oitenta e um isolados clínicos de MCR foram coletados para o estudo de genes que codificam bombas de efluxo, entre estes 20 isolados de *M. abscessus*, 10 isolados de *M. chelonae* e 15 isolados de *M. fortuitum*. Os 36 isolados de *M. massiliense* relacionados ao surto também foram estudados. Cepas padrão de MCR foram incluídas no estudo para análise filogenética, *M. massiliense* CCUG 48898, *M. agri* ATCC 27406, *M. aichiense* ATCC 27280, *M. aurum* ATCC 23366, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. chitae* ATCC 19627, *M. chubuense* ATCC 27278, *M. flavescens* ATCC 14474, *M. neoaurum* ATCC 25795, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. gadium* ATCC 27726, *M. parafortuitum* ATCC 19686, *M. phlei* ATCC 11758, *M. porcinum* ATCC 33776, *M. rhodesiae* ATCC 27024, *M. smegmatis* ATCC 14468, *M. vaccae* ATCC 15783.

4.2 Extração do DNA

A extração de DNA dos isolados clínicos foi realizada utilizando-se o Kit Basic Nuclisens Nasba Diagnostics (bioMérieux), baseado em um método publicado anteriormente (BOOM *et al.*, 1990).

Os ácidos nucléicos foram extraídos a partir de uma colônia de cada isolado e foram adicionados a 900 µL do tampão de lise (tiocianato de guanidina 5 mol/L, triton X-100, Tris HCl, pH 7,4). Após, as amostras foram mantidas a temperatura de 4-8°C por 12 horas e incubadas a 37°C por 30 minutos para dissolver os cristais formados. Adicionou-se 50 µL de sílica, que atua como a fase sólida onde os ácidos nucléicos ficam aderidos. Realizou-se então os procedimentos de purificação com tampão de lavagem (tiocianato de guanidina 5 mol/L e Tris/HCl), álcool 70% (Merck) e acetona P.A. Posteriormente, os ácidos nucléicos foram ressuspensos com tampão (Tris/HCl).

4.3 Identificação da espécie

A observação da taxa de crescimento foi tomada como uma evidência da presença de MCR. A confirmação definitiva e identificação da espécie foi baseada no sequenciamento parcial do gene *rpoB*.

A amplificação do DNA e sequenciamento dos produtos de PCR foi realizada com os *primers* MycoF (5' – GCAAGGTCACCCCGAAGGG – 3') e MycoR (5' – AGCGGCTGCTGGGTGATCATC – 3'), que amplificam um fragmento de 764 pb do gene *rpoB* (ADÉKAMBI *et al.*, 2003). As reações de PCR (50 µL) continham 5 µl de tampão 10X, 200 mM de cada desoxinucleotídeos trifosfato, 2 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10 mmol de cada *primer* (Invitrogen), 2 µL do DNA extraído e água

ultrapura. Estas reações foram submetidas a 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento de *primer* a 64°C por 30 segundos e alongamento do DNA a 72°C por 90 segundos. Cada programa de amplificação começou com uma etapa de desnaturação de 95°C por 1 minuto e terminou com uma etapa de elongação final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram purificados com o kit de purificação PureLink™ PCR (Invitrogen) e sequenciados utilizando-se o kit Big dye terminator v.3.1 de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems), com o seguinte programa: 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos, e extensão a 60°C por 4 minutos. Os produtos do sequenciamento foram purificados pelo kit de purificação Big Dye XTerminator™ (Applied Biosystems) e detectado em um ABI Prism 3110 DNA Sequence Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram alinhadas pelo software BioEdit (versão 7.0.5.3) (HALL, 1999), utilizando-se a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank adesão BX842574.1) como sequência de referência. A análise de homologia foi realizada com o auxílio do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e as sequências obtidas a partir de cada isolado foram comparadas com as sequências depositadas no GenBank.

4.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para analisar os 39 isolados de MCR (CLSI, 2003). As amostras foram avaliadas quanto à susceptibilidade à amicacina, cefoxitina, claritromicina, ciprofloxacina, doxiciclina, sulfametoxazol e tobramicina. Conforme recomendado, a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle.

Uma suspensão bacteriana foi preparada em caldo Mueller-Hinton (Difco, Detroit, Mich.) adicionado de 0,02% Tween 80 (Difco) e ajustada a um volume final de 5×10^5 UFC/mL. A concentração final foi de 1×10^4 a 5×10^4 UFC por tubo e o meio utilizado para a microdiluição foi o Mueller-Hinton caldo sem Tween 80. Os tubos inoculados foram incubados a 30°C e lidos após 72 horas. A CIM de cada agente foi determinada pela diluição seriada com fator dois e as concentrações dos antimicrobianos avaliados seguiram recomendações do CLSI (2003).

O controle de qualidade foi realizado observando-se o crescimento da cepa controle de *S. aureus* no meio de cultura. A CIM foi determinada para cada agente antimicrobiano e os resultados foram interpretados como sensível, intermediário e resistente (CLSI, 2003).

Segundo o CLSI (CLSI, 2003) os critérios para a interpretação da microdiluição em caldo para MCR a partir das leituras de CIM ($\mu\text{g/mL}$) são: amicacina (sensível ≤ 16 , intermediário = 32, resistente ≥ 64), cefoxitina (sensível ≤ 16 , intermediário 32 - 64, resistente ≥ 128), ciprofloxacina (sensível ≤ 1 , intermediário = 2, resistente ≥ 4), claritromicina (sensível ≤ 2 , intermediário = 4, resistente ≥ 8), doxiciclina (sensível ≤ 1 , intermediário 2 - 8, resistente ≥ 16), sulfametoxazol (sensível ≤ 32 , resistente ≥ 64) e tobramicina (sensível ≤ 4 , intermediário = 8, resistente ≥ 16).

Adicionalmente, o teste exato de Fisher foi usado para correlacionar os valores de CIM com os quatro hospitais envolvidos no surto. O nível de significância foi estabelecido ao valor de $P = 0,05$.

4.5 Teste de tolerância ao glutaraldeído

Quatro isolados (CRM 600, 609, 614 e 617) foram selecionados ao acaso, cada um proveniente de um dos quatro hospitais que apresentaram casos de infecção por *M. massiliense*, e foram avaliados pela capacidade de sobreviver após 30 minutos ou 10 horas de exposição a uma solução comercial de glutaraldeído 2%. O teste foi realizado pelo método de suspensão, como recomendado para procedimentos que necessitam um alto nível de desinfecção e esterilização (BEST *et al.*, 1988).

Cada teste foi repetido três vezes e foi utilizado as cepas de *M. abscessus* ATCC 19977 e *M. chelonae* ATCC 35752 como controle da reação. Culturas com menos de sete dias de crescimento em meio de Lowenstein-Jensen foram usadas para o preparo de uma suspensão bacteriana equivalente a escala 1,0 de McFarland. Foram adicionados 500 µL de suspensão bacteriana em 4,5 mL de uma solução de glutaraldeído ativada e incubado a 25°C. Após 30 minutos e 10 horas, uma alíquota de 0,5 mL de cada mistura contendo *M. massiliense* e glutaraldeído foi transferida para um novo tubo contendo o mesmo volume de sulfito de sódio a 1%. A solução foi misturada, semeada em meio de Lowenstein-Jensen e incubada a 35 °C por 60 dias.

4.6 Análise pela técnica de PFGE

Todos isolados de *M. massiliense* foram submetidos à análise genotípica pela técnica de PFGE. Uma cepa de *M. massiliense* BRA 100 isolada de um surto previamente ocorrido no Rio de Janeiro (CRM 0020) e duas cepas epidemiologicamente relacionadas, recuperadas a partir de amostras de

escarro em 2007, também provenientes do Rio de Janeiro (CRM 0270 e CRM 0273), foram incluídas nos testes para comparação.

Uma colônia de cada amostra foi inoculada em frascos contendo 40 mL de caldo Muller-Hinton suplementado com tween 80 a 0,1% e incubados a 37°C sob agitação constante até as culturas atingirem uma densidade óptica de aproximadamente 0,7 a 650 nm. As culturas foram centrifugadas a 4°C por 20 minutos a 3500 rpm e o sedimento congelado por no mínimo duas horas a 20°C. Depois de descongelado, o sedimento foi suspenso em 400 µL de solução STE-Tween 80 a 0,1% (NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 50mM, Tween 80 a 0,1%). Esta suspensão foi misturada a 400 µL de agarose LMP (*low melting point*) a 2% (Bio-Rad laboratories) para o preparo dos blocos. A agarose foi preparada em EDTA 125 mM e utilizada em uma temperatura aproximada de 50°C. Os blocos foram incubados por 10 minutos à temperatura de 2°C a 8°C.

Após, os blocos foram transferidos para placas de Elisa estéreis com tampa contendo 2 mL da solução de lise (TE e lisozima 10 mg/mL) e incubadas a 37°C sob agitação durante uma noite. Posteriormente os blocos foram incubados a 4°C por 1 hora e depois retirados da solução de lise, sendo incubados novamente a 4°C por 1 hora em 2 mL de EDTA 0,5 M contendo sarcosil a 1%. Após serem retirados desta solução, os blocos foram incubados a 55°C por 24 horas sob agitação em uma solução contendo 1 mL de EDTA a 0,5 M adicionado de 40µL de proteinase K (50 mg/mL). Posteriormente, os blocos foram lavados 2 vezes com 2 mL de TE 1X por 30 minutos a 4°C e incubados por 1 hora a 55°C em 2mL de TE 1X contendo 0,12 mg/mL de PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoreto, Sigma). Após esta etapa, foram lavados 3

vezes em 2 mL de TE 1X por 30 minutos à temperatura ambiente e lavados novamente em 5 mL de Triton a 0,1% a 4°C por 90 minutos antes da digestão.

Quatro enzimas de restrição foram testadas em relação ao seu poder discriminatório: *Asel* e *Xbal* (New England Biolabs), *Dral* (Promega) e *SpeI* (Bio-Rad Laboratories) (tabela 1). Para a digestão usando as enzimas *Asel*, *Xbal* e *SpeI* os blocos foram ressuspensos em 150 µL do tampão da enzima contendo 25 U de *SpeI*, 25 U de *Xbal* e 40 U de *Asel* (usadas separadamente) e incubados a 37°C por 12 horas, 16 horas ou 18 horas, respectivamente. Para a digestão de *Dral* os blocos foram ressuspensos em 100 µL de tampão da enzima contendo 100 U de *Dral* (Promega) (COLEMAN *et al.*, 2003; SAMPAIO *et al.*, 2006), e incubados a 37°C por 21 horas.

Após a digestão os blocos foram lavados em EDTA 0,05 M a 4°C por 15 minutos, aplicados em gel de agarose para PFGE (Bio-Rad) a 1% e submetidos a eletroforese em tampão TBE 0,5X.

Todas as eletroforeses foram realizadas em um aparelho CHEF-DR III (Bio-Rad) nas seguintes condições: voltagem de 6V/cm, ângulo de 120° e temperatura de 14°C. Para a eletroforese da digestão com *Dral*, foi aplicado um pulso inicial de 1,6 segundos e final de 21,3 segundos por 24 horas (DUARTE *et al.*, 2009). Para a eletroforese com *Asel* foi usado um pulso de 1 a 5,6 segundos por 10 horas, 5,6 a 16,6 segundos por 6 horas e 16,6 a 23 segundos por 4 horas. Para a eletroforese com *SpeI*, utilizou-se um pulso de 0,5 a 4 segundos por 10 horas, 4 a 12,2 segundos por 6 horas e 12,2 a 17 segundos por 4 horas. Para a eletroforese com *Xbal*, foi usado um pulso de 0,5 a 10 segundos por 16 horas e um pulso de 10 a 17 segundos por 4 horas (SINGH *et al.*, 1999).

Após a eletroforese o gel foi corado por 30 minutos com brometo de etídeo (0,5 mg/L) e fotografado em transluminador sob luz UV. Um marcador de peso molecular (New England BioLabs) foi incluído na primeira e última posição do gel.

Os perfis de PFGE gerados foram analisados com auxílio de um programa comercial para análise molecular - GelCompar software (Matemática Aplicada). Os padrões dos fragmentos foram interpretados como descrito anteriormente (TENOVER *et al.*, 1995).

Tabela 6 - Número de bandas formadas na análise de PFGE com as enzimas de restrição *DraI*, *SpeI*, *AseI* e *XbaI*.

Enzima de Restrição	Bandas formadas (Kb)
<i>DraI</i>	10 (36 - 194 Kb)
<i>XbaI</i>	14 (36 - 165 Kb)
<i>AseI</i>	14 (36 - 235 Kb)
<i>SpeI</i>	18 (36 - 257 Kb)

4.7 PCR e sequenciamento dos genes *gyrA* e *gyrB*

Os genes *gyrA* e *gyrB* foram amplificados conforme método publicado por Guillemin *et al.* (1995) usando-se os *primers* Pri9 (5-CGCCGCGTGCTG/CATGCA/GATG-3) e Pri8 (5-C/TGGTGGG/GTCA/GTTA/GCCC/TGGCGA-3) para o gene *gyrA* (GUILLEMIN *et al.*, 1995) e os *primers* GyrbA (5-GAGTTGGTGCGGCGTAAGAGC-3) (DAUENDORFFER *et al.*, 2003) e GyrbE (5-CGGCCATCAA/GCACGATCTTG-3) (GUILLEMIN *et al.*, 1998) para o gene *gyrB*. Na tentativa de melhorar o desempenho das reações, foram testados dois tipos de enzimas polimerase

para a amplificação dos genes: *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen).

A amplificação dos genes foi realizada com 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento de primers a 56°C por 1 minuto, e alongamento do DNA a 72°C por 1 minuto. O programa de amplificação iniciou com uma etapa de desnaturação a 94°C por 7 minutos e terminou com uma etapa de elongação final a 72°C por 10 minutos. O tamanho dos fragmentos amplificados foi de 216 pb para *gyrA* e 268 pb para *gyrB*.

Os produtos de amplificação foram purificados com o kit de purificação PureLink™ PCR (Invitrogen) e sequenciados utilizando o kit Big dye terminator v.3.1 de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems). A sequência de nucleotídeos de cada produto de PCR foi determinada independentemente em ambas as fitas com os mesmos *primers* utilizados na reação de PCR. O produto do sequenciamento foi detectado em um ABI Prisma 3110 DNA Sequence Analyzer (Applied Biosystems).

4.8 Amplificação e sequenciamento dos genes *tap* e *lfrA*

Para a detecção dos genes *tap* foi utilizado os primers Tap 1 (5'-GTC GCG TTC CCG TGG CTG GT-3') e Tap 2 (5'-CGA TAC CGG GGC CGA CGA TG-3') (ESTEBAN *et al.*, 2009), que amplificam um fragmento de 363 pb. As reações de PCR (50 µL) continham 5 µL de tampão 10X, 200 mM de cada desoxinucleotídeos trifosfato, 2 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10 mmol de cada primer (Invitrogen), 2 µl do DNA extraído e água ultrapura. Estas reações foram submetidas a 30 ciclos de desnaturação por 10 minutos a 94°C, seguido por um anelamento de 1 minuto a 94°C e uma etapa de elongação a 72°C por 3 minutos.

O gene *lfrA* foi amplificado com os *primes* RG 391 (5'-CGC CCC GAG CAC CGA GTT-3') e RG 392 (5'-GAT GAT CGA CAG GAA GTT-3'), gerando um produto de 547 pb. As reações de PCR (50 µL) continham 5 µL de tampão 10X, 200 mM de cada desoxinucleotídeos trifosfato, 2 mM MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10 mmol de cada primer (Invitrogen), 2 µl do DNA extraído e água ultrapura. Foi utilizado as seguintes condições de amplificação: uma etapa inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 61°C por 1 minuto e uma fase de extensão a 72°C por 45 segundos, terminando com uma etapa de alongação de 15 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram purificados com o kit de purificação PureLink™ PCR (Invitrogen) e sequenciados utilizando-se o kit Big dye terminator v.3.1 de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems). O produto do sequenciamento foi detectado em um ABI Prism 3110 DNA Sequence Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.1 e comparadas com sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A árvore filogenética foi construída utilizando-se o MEGA versão 4.1 e a análise estatística foi realizada pelo teste exato de Fisher.

5. RESULTADOS

5.1 Achados clínicos e descrição do surto

De acordo com dados obtidos, a idade média dos pacientes foi de 50 anos (24 – 87 anos) e a maioria (73,0%) eram mulheres. Um hospital (H1), concentrou 77% dos casos estudados (tabela 2). Os pacientes apresentaram abscessos no local da cirurgia e o tempo da cirurgia até o início dos sinais clínicos foi de 5 a 60 dias. A maioria dos pacientes (n=33; 84,6%) foram tratados com terapia antimicrobiana consistindo de claritromicina, amicacina e terezidona. Os outros pacientes receberam um tratamento inicial com claritromicina, amicacina e minociclina. A maioria dos casos (n=37; 94,9%) progrediu para a cura e duas mortes foram associadas à infecção por MCR.

5.2 Identificação das espécies

Os 39 isolados estudados foram identificados, por cultura microbiológica, como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*. O crescimento dos isolados em meio de cultura foi observado em menos de sete dias e a coloração de Ziehl-Nielsen mostrou a presença de bacilos álcool-ácido resistentes.

As sequências do gene *rpoB* de 36 isolados foram idênticas e apresentaram 100% de similaridade com a sequência de *M. massiliense* cepa INCQS 594 (GenBank EU117207). Uma sequência (isolado número 594) foi idêntica à sequência de *M. abscessus* cepa P02 (GenBank FJ590436.1), um isolado (número 586) foi semelhante à cepa de *M. chelonae* ATCC 19237 (GenBank AY262740.1) e outro isolado (número 589) apresentou a sequência similar à cepa *M. fortuitum* CIP 104534T (GenBank AY147165.1).

Tabela 7 - Dados (sexo, idade, tipo de cirurgia, data do procedimento e hospital) dos pacientes envolvidos no surto causado por micobactérias de crescimento rápido em Curitiba, Paraná.

Amostra	Sexo	Idade	Tipo de cirurgia	Hospital	Data de cirurgia
605	M	87	COLECISTECTOMIA	1	24/11/07
618	F	32	CARDIOPLASTIA HIATAL	1	24/10/07
590	M	56	CARDIOPLASTIA HIATAL	1	05/11/07
611	M	62	BARIATRICA	2	13/10/07
585	M	54	HERNIORRAFIA	1	05/12/07
609	F	34	BARIATRICA	3	09/11/07
606	F	57	CARDIOPLASTIA HIATAL	1	26/10/07
593	M	47	COLECISTECTOMIA	2	20/09/07
619	F	26	SIMPATECTOMIA TORÁCICA	1	06/11/07
615	M	38	BARIATRICA	2	29/10/07
616	F	54	COLECISTECTOMIA	1	12/11/07
597	M	65	COLECISTECTOMIA	1	19/11/07
591	M	56	CARDIOPLASTIA HIATAL	1	07/11/07
608	F	58	CARDIOPLASTIA HIATAL	1	13/11/07
604	M	29	APENDICECTOMIA	2	23/08/07
600	F	50	PIELOPLASTIA	1	19/09/07
588	M	50	GASTROPLASTIA	2	21/11/07
583	F	65	COLECTOMIA	1	23/11/07
595	F	45	CARDIOPLASTIA HIATAL	1	22/11/07
587	F	56	COLECISTECTOMIA	1	10/10/07
592	F	55	CARDIOPLASTIA HIATAL	1	22/11/07
607	F	72	COLECISTECTOMIA	1	20/10/07
599	M	81	COLECISTECTOMIA	1	08/10/07
613	F	28	OOFORECTOMIA	1	09/10/07
612	M	77	CARDIOPLASTIA HIATAL	1	25/10/07
617	M	49	APENDICECTOMIA	2	24/08/07
601	F	24	COLECISTECTOMIA	1	14/11/07
610	F	36	MIOMECTOMIA	1	19/10/07
602	F	37	COLECISTECTOMIA	1	19/11/07
614	M	32	BARIATRICA	4	29/10/07
603	F	43	CARDIOPLASTIA HIATAL	1	21/11/07
584	F	50	COLECISTECTOMIA	1	19/10/07
596	M	68	COLECISTECTOMIA	1	21/11/07
306	F	47	GASTROPLASTIA	1	22/11/07
308	F	39	COLECISTECTOMIA	1	28/10/07
589	F	28	COLECISTECTOMIA	1	23/09/07
594	F	56	COLECISTECTOMIA	1	25/08/07
586	F	45	BARIATRICA	1	13/07/07

5.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Todos isolados de *M. massiliense* foram sensíveis à claritromicina ($\text{CIM}_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$) e amicacina ($\text{CIM}_{90} \leq 16 \mu\text{g/mL}$), mas resistentes à doxiciclina, tobramicina, cefoxitina e sulfametoxazol. Um isolado (2,8%) de *M. massiliense* apresentou sensibilidade à ciprofloxacina, enquanto o restante foi resistente.

M. abscessus foi sensível à amicacina ($\text{CIM}_{90} \leq 16 \mu\text{g/mL}$) e claritromicina ($\text{CIM}_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$) e apresentou sensibilidade intermediária a cefoxitina ($\text{CIM}_{90} \leq 64 \mu\text{g/mL}$). No entanto, este isolado foi resistente a ciprofloxacina, doxiciclina, tobramicina e sulfametoxazol.

M. chelonae foi sensível à claritromicina ($\text{CIM}_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$) e intermediário à amicacina ($\text{CIM}_{90} \leq 16 \mu\text{g/mL}$) e tobramicina ($\text{CIM} \leq 4 \mu\text{g/mL}$), porém resistentes à cefoxitina, ciprofloxacina, doxiciclina e sulfametoxazol.

M. fortuitum foi sensível à amicacina ($\text{CIM}_{90} \leq 16 \mu\text{g/mL}$), claritromicina ($\text{CIM}_{90} \leq 2 \mu\text{g/mL}$) e ciprofloxacina ($\text{CIM}_{90} \leq 1 \mu\text{g/mL}$), mas resistentes à doxiciclina, sulfametoxazol e tobramicina. Este isolado apresentou resistência intermediária à cefoxitina ($\text{CIM}_{90} \leq 64 \mu\text{g/mL}$). Dados mostrados na tabela 3.

Não foi encontrada uma diferença significativa entre os valores de CIM e os hospitais onde as amostras foram coletadas ($P > 0.05$).

5.4 Teste de tolerância ao glutaraldeído

Os quatro isolados de *M. massiliense* sobreviveram após 30 minutos e 10 horas de exposição à solução de glutaraldeído 2%. Colônias foram visíveis em meio de Lowenstein-Jensen após 7 dias de crescimento. Os isolados foram confirmados por Ziehl-Neelsen e pela amplificação do gene *rpoB*. As cepas controle de *M. abscessus* ATCC 19977 e *M. chelonae* ATCC 35752 não sobreviveram após 30 minutos de exposição.

Tabela 8 – Perfil de susceptibilidade dos 36 isolados de *M. massiliense* frente aos antimicrobianos testados.

Isolado	AMK	FOX	CIP	CLR	DOX	TOB	SLF
583	16 S	256 R	4 R	≤ 0,5 S	32 R	≥32 R	≥64 R
584	8 S	128 R	4 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
585	16 S	256 R	4 R	≤ 0,5 S	32 R	≥32 R	≥64 R
587	8 S	128 R	16 R	1 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
588	16 S	128 R	≥16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
590	16 S	256 R	16 R	≤ 0,5 S	16 R	32 R	≥64 R
591	16 S	128 S	16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
592	16 S	256 R	16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
593	16 S	256 R	8 R	≤ 0,5 S	32 R	≥32 R	≥64 R
595	16 S	128 S	16 R	≤ 0,5 S	32 R	≥32 R	≥64 R
596	16 S	128 S	16 R	≤ 0,5 S	32 R	≥32 R	≥64 R
597	8 S	256 R	4 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
598	16 S	128 R	8 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
599	16 S	128 R	≥16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
600	8 S	128 R	16 R	≤ 0,5 S	32 R	≥32 R	≥64 R
601	16 S	128 R	≤0,125 S	≥0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
602	8 S	128 R	16 R	≤ 0,5 S	32 R	≥32 R	≥64 R
603	16 S	256 R	16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
604	16 S	256 R	16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
605	16 S	128 R	16 R	1 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
606	16 S	128 R	≥ 16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
607	8 S	128 R	8 R	≤ 0,5 S	32 R	32 R	≥64 R
608	8 S	256 R	16 R	≤ 0,5 S	32 R	32 R	≥64 R
609	16 S	128 R	≥ 16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	32 R	≥64 R
610	8 S	128 R	16 R	≤ 0,5 S	32 R	32 R	≥64 R
611	16 S	128 R	8 R	≤ 0,5 S	≥32 R	32 R	≥64 R
612	8 S	128 R	8 R	≤ 0,5 S	16 R	32 R	≥64 R
613	8 S	256 R	8 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
614	8 S	256 R	16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	32 R	≥64 R
615	8 S	256 R	8 R	≤ 0,5 S	≥32 R	≥32 R	≥64 R
616	8 S	128 R	8 R	≤ 0,5 S	32 R	≥32 R	≥64 R
617	8 S	256 R	16 R	≤ 0,5 S	32 R	32 R	≥64 R
618	4 S	256 R	16 R	1 S	32 R	32 R	≥64 R
619	8 S	128 R	16 R	≤ 0,5 S	≥32 R	32 R	≥64 R
589	2 S	64 Int	≤0,125 S	16 S	≥32 R	16 R	≥64 R
594	16 S	32 Int	16 R	8 S	≥32 R	16 R	≥64 R
586	32 Int	256 R	16 R	2 S	≥32 R	8 Int	≥64 R

M. massiliense, isolado 583 até 619; *M. fortuitum*, isolado 589; *M. abscessus*, isolado 594; *M. chelonae*, isolado 586.

5.5 Análise da técnica de PFGE

A análise de PFGE revelou que as cepas de *M. massiliense* provenientes do surto foram classificadas em um único grupo geneticamente relacionado (figura 1, figura 2, figura 3). Todas as enzimas de restrição testadas forneceram a mesma capacidade discriminatória, indicando que todas podem ser utilizadas para a comparação de isolados de *M. massiliense*. Porém, a visualização dos fragmentos no gel com relação a intensidade e definição foi melhor observada quando utilizamos a enzima *DraI* (figura 1). Foi necessário repetir de 2 a 3 vezes a análise de PFGE com as enzimas *SpeI* (figura 2), *Asel* (figura 3) e *XbaI* (figura 4) para termos uma boa visualização dos padrões, fato não observado com a utilização de *DraI*. Adicionalmente, um menor número de bandas geradas com a *DraI* facilitou a visualização. Assim, esta foi a enzima de escolha para a análise de todos os isolados do estudo.

Os padrões de PFGE dos 36 isolados de *M. massiliense* foram semelhantes ao isolado recuperado do surto ocorrido na cidade do Rio de Janeiro (cepa CRM 0020, Figura 4). Os dois isolados de *M. massiliense* obtidos a partir de amostras de escarro (0270 CRM e CRM 0273) não apresentaram padrões eletroforéticos idênticos quando comparados aos isolados de Curitiba e Rio de Janeiro.

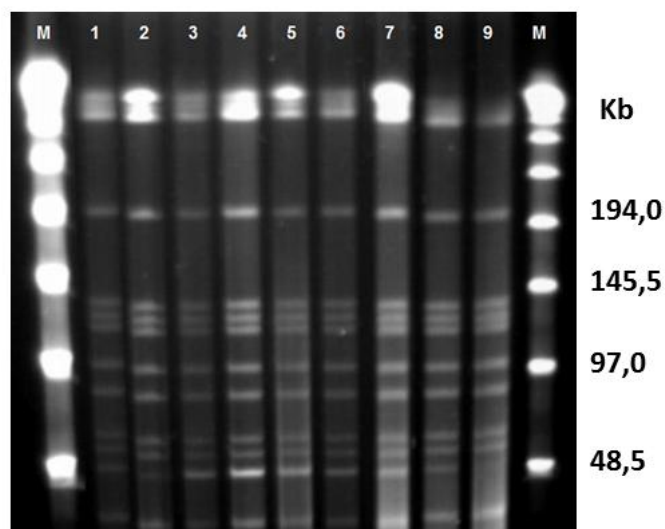


Figura 3 – PFGE utilizando a enzima *Dral* de isolados de *M. massiliense* provenientes de um surto em Curitiba. M, marcadores de tamanho molecular (DNA Lambda variando de 48,5 a 1.018,5 kb); posição 1, CRM-587, posição 2, CRM-591, posição 3, CRM-592, posição 4, CRM-593, posição 5, CRM- 595, posição 6, CRM-596, posição 7, CRM-598, posição 8, CRM-602 e posição 9, CRM-604.

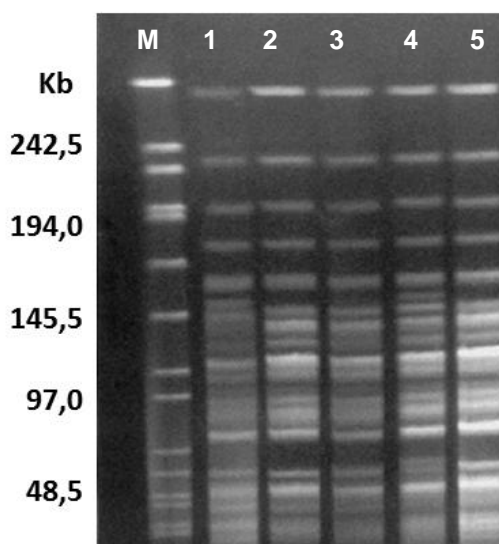


Figura 4 – PFGE utilizando a enzima *SpeI* de isolados de *M. massiliense* provenientes de um surto em Curitiba. M, cepa de referência de *S. aureus* NCTC 8325 usada como marcador de tamanho molecular; posição 1, CRM-587, posição 2, CRM-591, posição 3, CRM-592, posição 4, CRM-593, posição 5, CRM- 595.

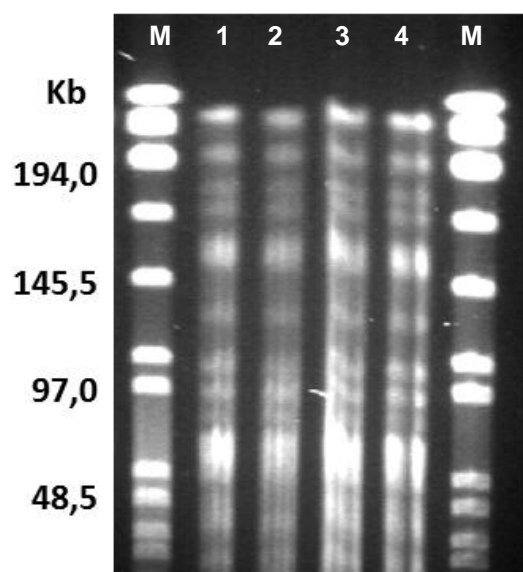


Figura 5 – PFGE utilizando a enzima *Asel* de isolados de *M. massiliense* provenientes de um surto em Curitiba. M, cepa de referência de *S. aureus* NCTC 8325 usada como marcador de tamanho molecular; posição 1, CRM-020, posição 2, CRM-591, posição 3, CRM-592, posição 4, CRM-593.

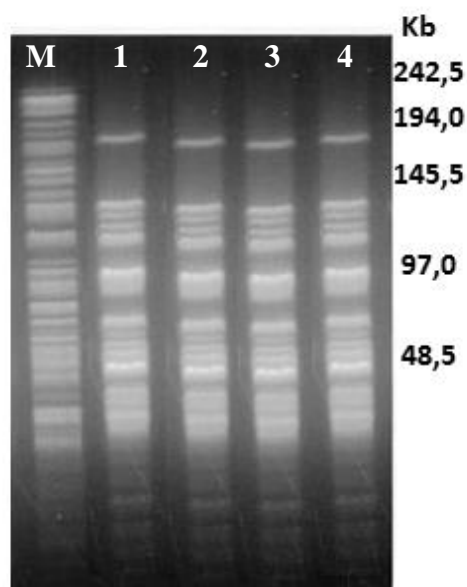


Figura 6 – PFGE utilizando a enzima *XbaI* de isolados de *M. massiliense* provenientes de um surto em Curitiba. M, cepa de referência de *S. aureus* NCTC 8325 usada como marcador de tamanho molecular; posição 1, CRM-020, posição 2, CRM-591, posição 3, CRM-592, posição 4, CRM-593.

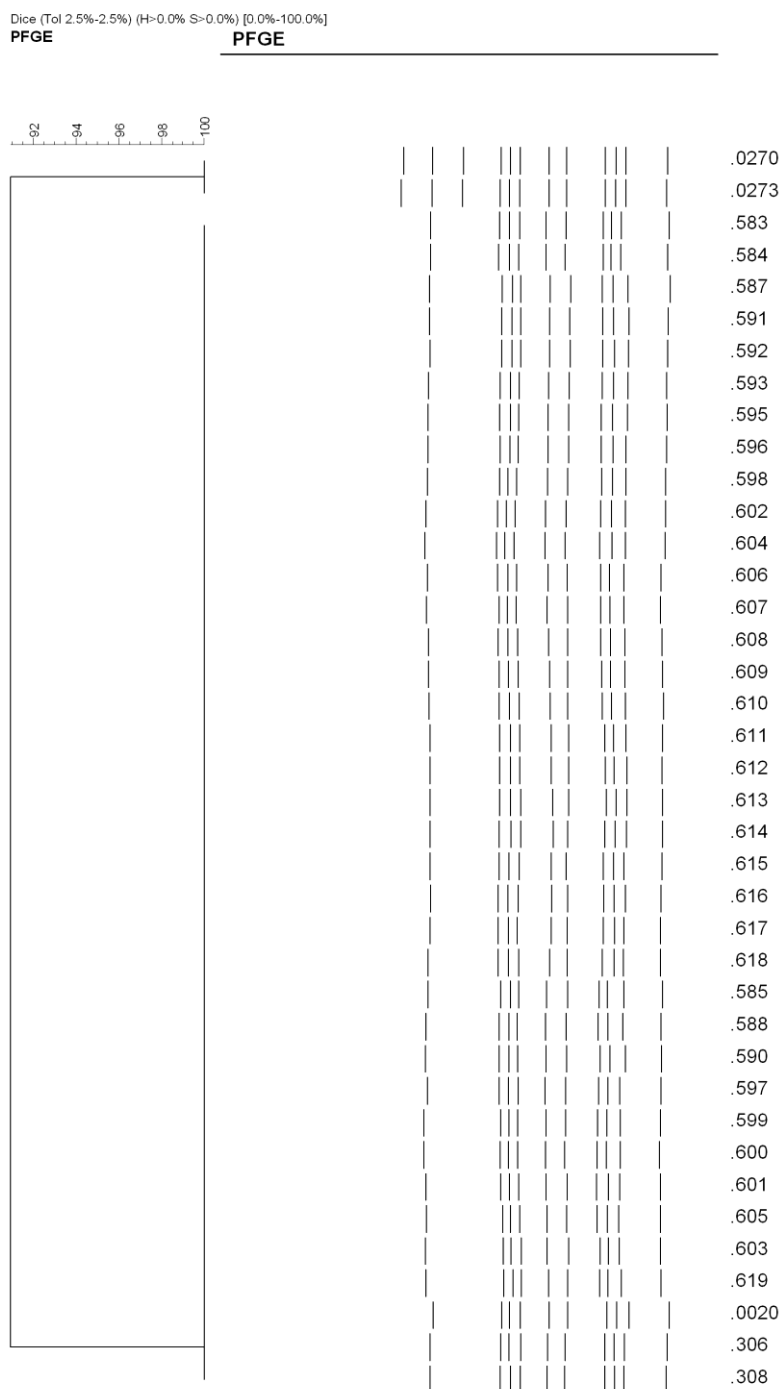


Figura 7 - Dendrograma referente aos padrões de PFGE em isolados de *M. massiliense*. A comparação foi feita utilizando o GelCompar software (Applied Maths). O coeficiente de Dice foi utilizado para calcular as percentagens de similaridade entre os perfis. Os padrões de PFGE do *M. massiliense* isolado no surto do Rio de Janeiro (CRM 0020) e duas cepas epidemiologicamente independentes de pacientes provenientes do Rio de Janeiro (CRM 0270 e CRM 0273) foram incluídos na análise. ^a Hn, isolado obtido de paciente submetido à cirurgia no hospital ^b RJ, isolado recuperado do Rio de Janeiro

5.6 PCR e sequenciamento dos genes *gyrA* e *gyrB*

A enzima *Platinum Taq Polimerase* apresentou ótimos resultados quanto à quantidade e grau de pureza do amplificado, gerando produtos apenas com o fragmento de interesse. A *Platinum Taq Polimerase High Fidelity* gerou além do fragmento de interesse, outros inespecíficos, não apresentando a eficiência esperada. Assim, devido a estes resultados todas as amplificações foram realizadas com a enzima *Platinum Taq Polimerase*.

As sequências de peptídeos de GyrA e GyrB (aminoácidos 74 ao 113 e aminoácidos 495 ao 533, respectivamente) foram deduzidas das sequências de nucleotídeos. Resultados apresentados nas figura 1, 2, 3 e 4.

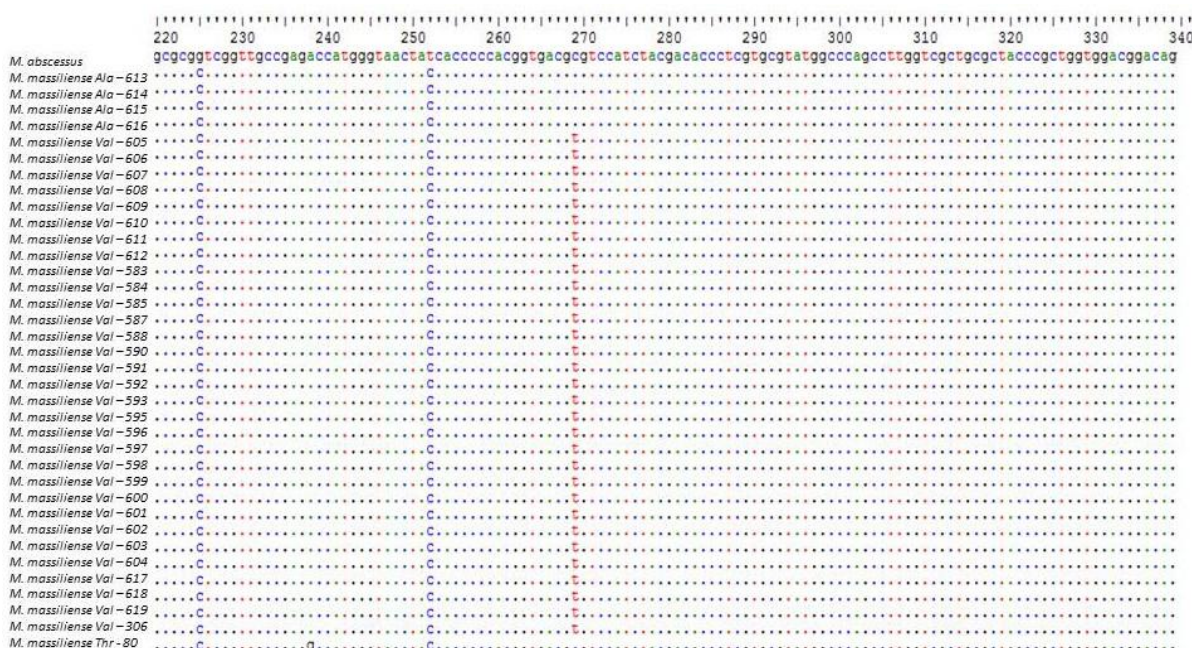


Figura 8 – Sequenciamento da região QRDR (120 pb) do gene *gyrA* nos 36 isolados de *M. massiliense*.

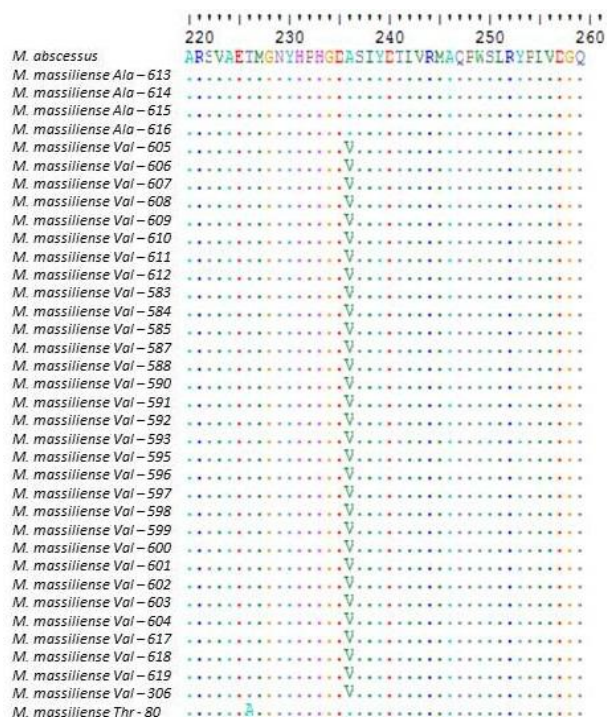


Figura 9 – Sequência de aminoácidos, deduzida a partir da sequência de nucleotídeos, da região QRDR do gene *gyrA* nos 36 isolados de *M. massiliense*

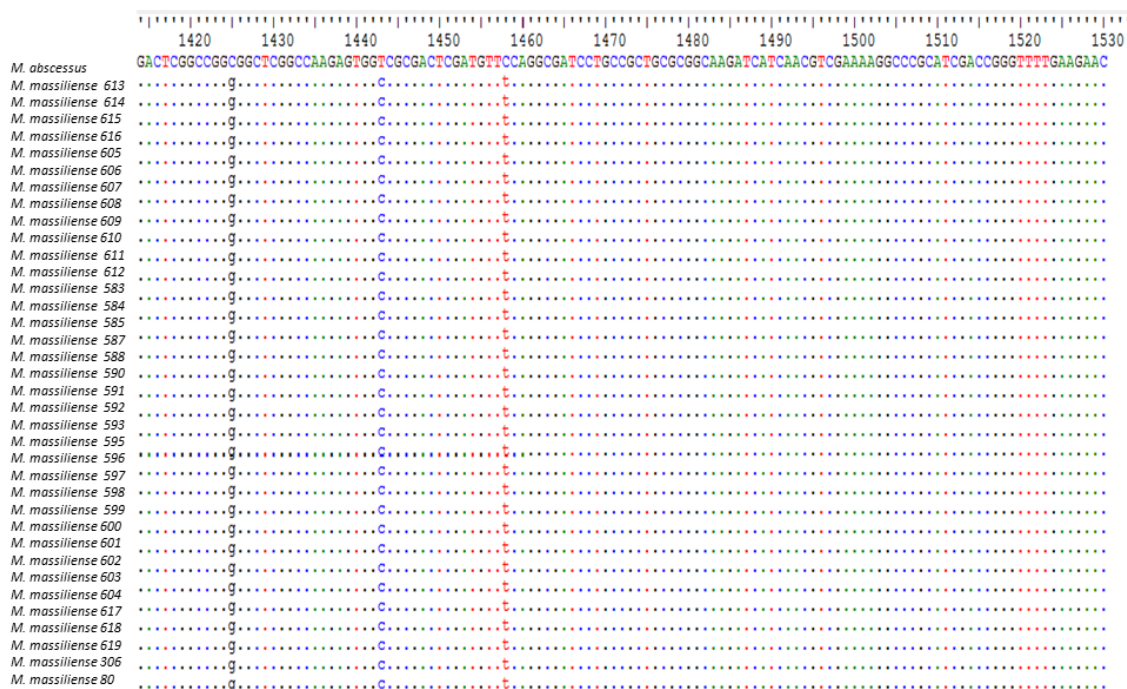


Figura 10 – Sequenciamento da região QRDR do gene *gyrB* (116 pb) nos 36 isolados de *M. massiliense*.

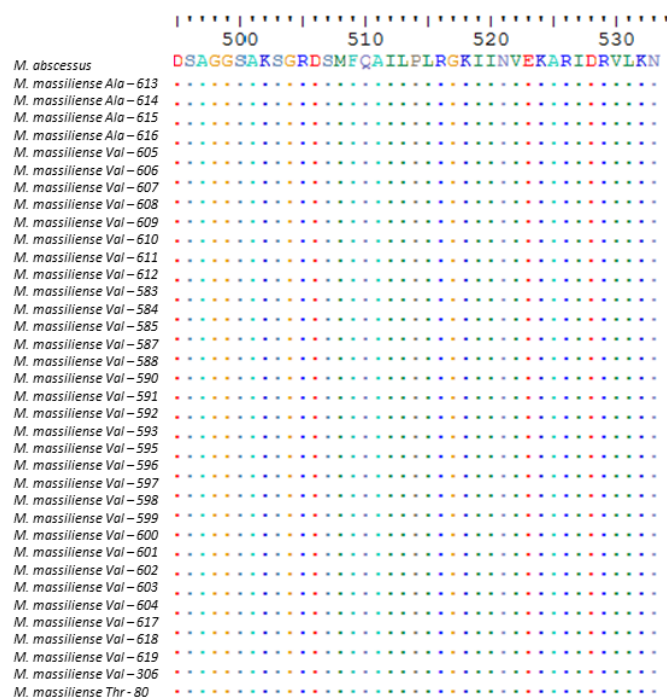


Figura 11 – Sequência de aminoácidos, deduzida a partir da sequência de nucleotídeos, da região QRDR do gene *gyrB* nos 36 isolados de *M. massiliense*

Trinta e um (88.6%) isolados resistentes à ciprofloxacina apresentaram uma substituição no códon 90 (Ala-90→Val) e nenhum isolado apresentou substituição na posição Asp-94. No entanto, 4/35 (11.4%) isolados resistentes à ciprofloxacina não apresentaram mutação em Ala-90 e Asp-94 (tabela 1).

Tabela 9 – Mutações em *gyrA*, CIM e perfil de susceptibilidade dos 36 isolados de *M. massiliense*.

Isolados de <i>M. massiliense</i>	Nucleotídeos no códon 90	Aminoácido na posição 90 em GyrA QRDR	CIM (µg/ml) da ciprofloxacina	Perfil de susceptibilidade a droga
613, 614, 615, 616	GCG	Alanina	4	R
605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612	GCG→GTG	Ala→Val	8	R
583, 584, 585, 587, 588, 590, 591, 592, 593, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604	GCG→GTG	Ala→Val	16	R
617, 618, 619, 306	GCG→GTG	Ala→Val	≥16	R

O isolado de *M. massiliense* sensível à ciprofloxacina apresentou somente a substituição de um aminoácido na posição Thr-80→Ala, não observado no restante dos isolados.

M. abscessus resistente à ciprofloxacina apresentou uma substituição em Asp-94→Gly e *M. chelonae* apresentou duas substituições, Ala-90→Val e Asp-94→Asn; não foi encontrada substituição na sequência de GyrA do *M. fortuitum* sensível à ciprofloxacina.

Nenhuma mutação foi encontrada no gene *gyrB* dos isolados de *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e em todos os isolados de *M. massiliense* estudados.

5.7 Amplificação e sequenciamento dos genes *tap* e *lfrA*

No total, 28 isolados (34,56%) foram positivos para a presença do gene *lfrA*. Entre estes, compreendem 15 isolados (41,67% desta espécie) de *M. massiliense*, seis isolados (30%) de *M. abscessus*, quatro isolados (40%) de *M. chelonae* e três isolados (20%) de *M. fortuitum*. Os 15 isolados de *M. massiliense* positivos para o gene *lfrA* apresentaram resistência fenotípica à ciprofloxacina (CIM ≥ 4 mg/L), enquanto 20 isolados resistentes foram negativos para a presença do gene. Todos os isolados de *M. abscessus* e *M. chelonae* positivos para o gene *lfrA* eram fenotipicamente resistentes à ciprofloxacina. No entanto, os três isolados de *M. fortuitum* positivos para a presença do gene, foram considerados susceptíveis (CIM $\leq 0,125$ m/L) à ciprofloxacina (TABELA 1).

Dos 81 isolados de MCR, 42 isolados (51,85%) foram positivos para a presença do gene *tap*, entre estes 22 isolados (61,11% desta espécie) de *M. massiliense*, 11 isolados (55%) de *M. abscessus*, sete isolados (70%) de *M. chelonae* e dois isolados (13,33%) de *M. fortuitum*. Os 22 isolados de *M. massiliense* positivos para o gene *tap* apresentaram resistência fenotípica à doxiciclina (MIC ≥ 16 mg/L), enquanto 14 isolados resistentes foram negativos para a presença do gene. Todos os isolados de *M. abscessus* e *M. chelonae* positivo para o gene *tap* eram fenotipicamente resistentes à doxiciclina. No entanto, dois isolados de *M. fortuitum* positivos para a presença do gene, foram considerados sensíveis (MIC ≤ 1 mg/L) à doxiciclina (TABELA 1).

Tabela 10 - Relação entre o perfil de susceptibilidade à doxiciclina e ciprofloxacina e a presença dos genes *tap* e *lfrA* em isolados de micobactérias de crescimento rápido.

Espécie dos isolados	Número de isolados							
	DOX-S	<i>tap</i> +	DOX-R	<i>tap</i> +	CIP-S	<i>lfrA</i> +	CIP-R	<i>lfrA</i> +
<i>M. massiliense</i>	-	-	36	22	1	0	35	15
<i>M. abscessus</i>	-	-	20	11	-	-	20	6
<i>M. chelonae</i>	-	-	10	7	-	-	10	4
<i>M. fortuitum</i>	15	2	-	-	15	3	-	-

DOX- doxiciclina; CIP-ciprofloxacina; S- sensível; R-resistente

O teste exato de Fisher ($P < 0,05$) mostrou uma relação estatística significativa na comparação do perfil de susceptibilidade dos isolados à doxiciclina e ciprofloxacina com a presença dos genes *tap* e *lfrA*, respectivamente.

O sequenciamento dos gene *lfrA* em nossos isolados apresentou 90-96% de similaridade com a sequência de *M. smegmatis* (número de acesso no GenBank U40487.1). As sequências obtidas do gene *tap* mostraram uma similaridade de 93-99% com a sequência de *M. fortuitum* (número de acesso no GenBank AJ000283.1). A análise filogenética das sequências estudadas está ilustrada nas figuras 1 e 2.

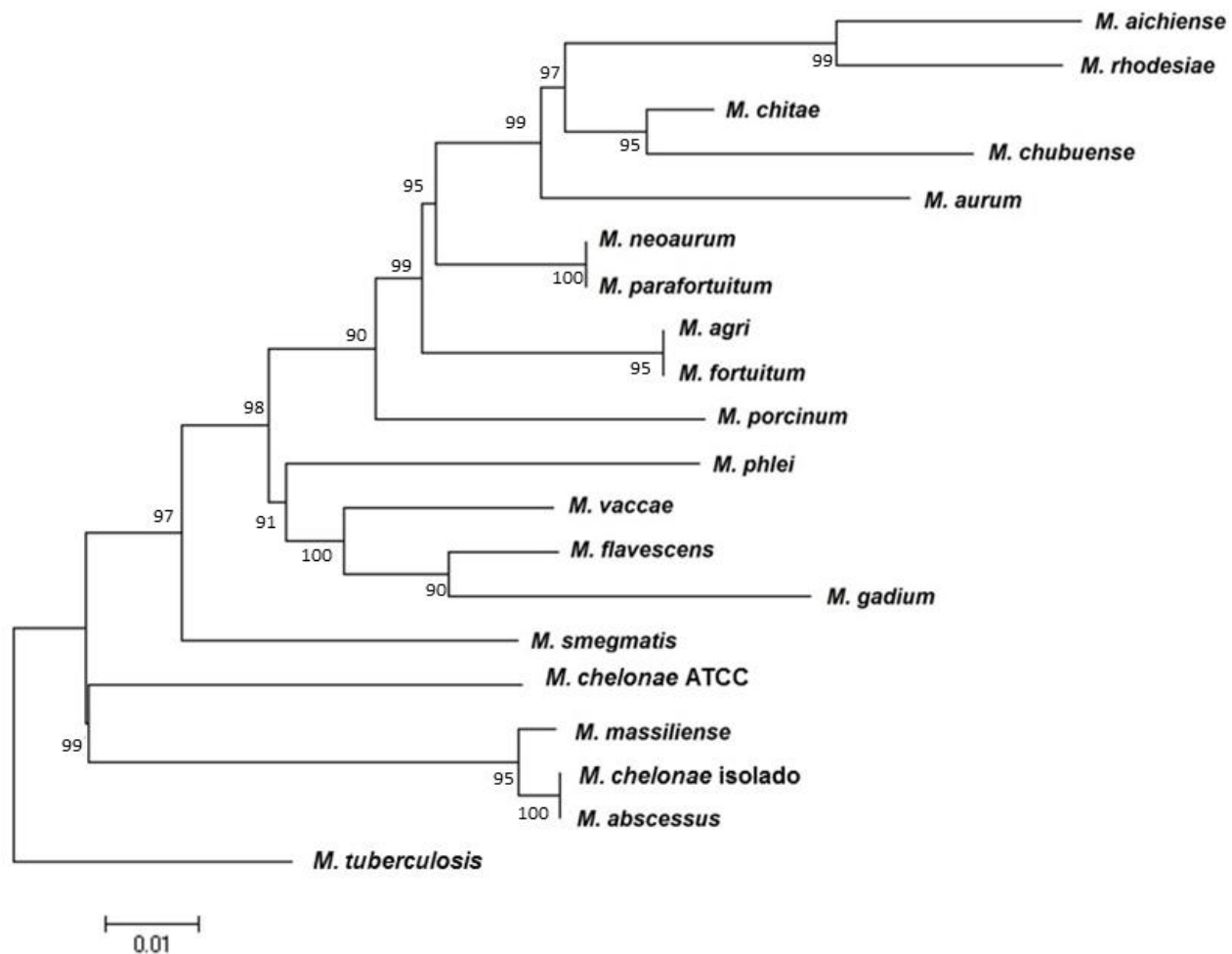


Figura 12 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *tap* construída pelo método de neighbor-joining. Os valores de *bootstrap* (*bootstrap*: 1000) são apresentados nos ramos da árvore.

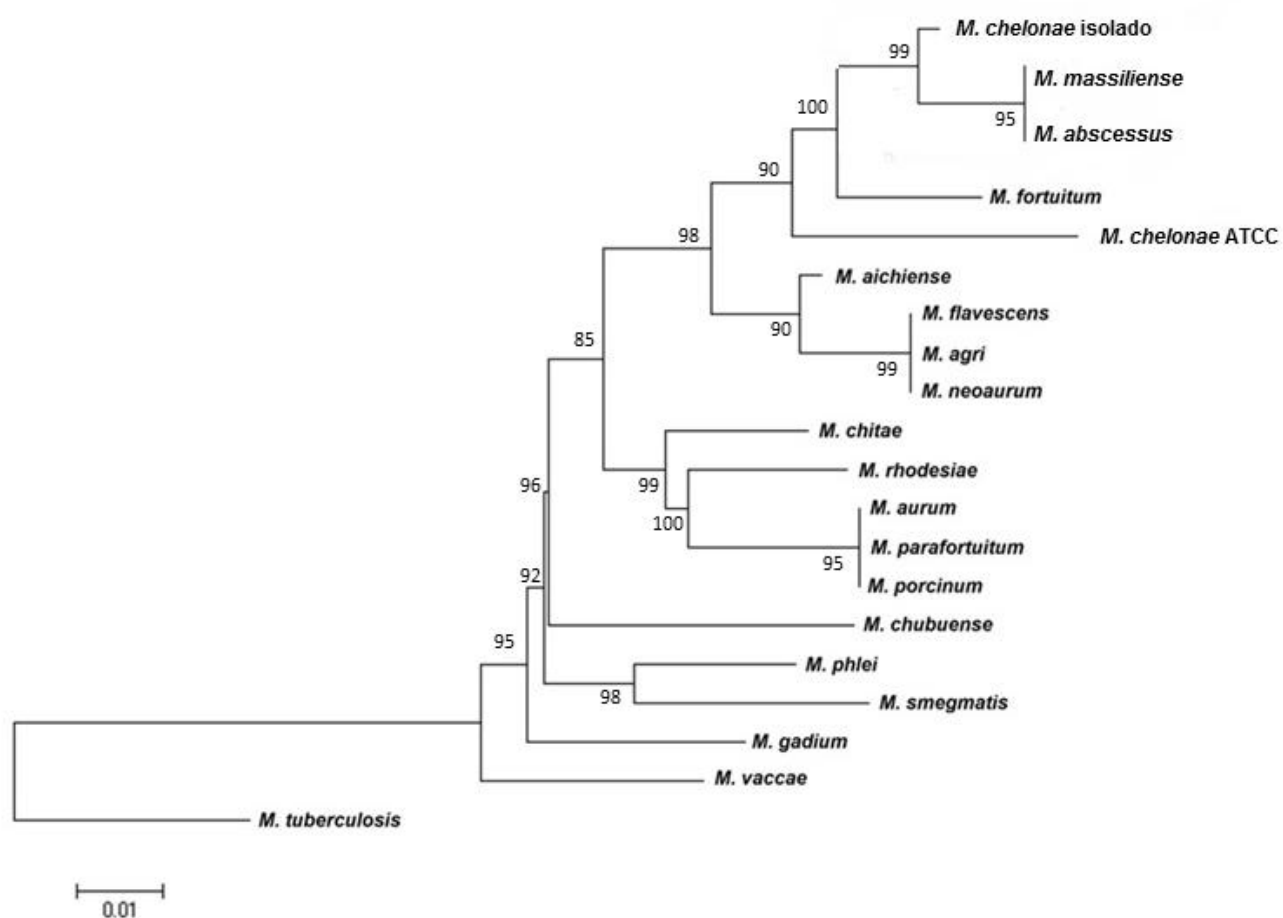


Figura 13 – Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *lfrA* construída pelo método de neighbor-joining. Os valores de bootstrap (*bootstrap*: 1000) são apresentados nos ramos da árvore.

6. DISCUSSÃO

6.1 IDENTIFICAÇÃO E TIPIIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium massiliense*

Este estudo descreveu a identificação molecular e aspectos epidemiológicos de um único clone de *M. massiliense* isolado de um surto de infecções cirúrgicas em Curitiba, Paraná. Três surtos relacionados às infecções por *M. massiliense* foram notificados no Brasil nas cidades de Goiânia, Belém e Rio de Janeiro (figura 6) (CARDOSO *et al.*, 2008; VIANA-NIERO *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009). O sequenciamento parcial do gene *rpoB* e a análise de PFGE confirmou a semelhança dos nossos isolados, com os isolados dos surtos anteriores.

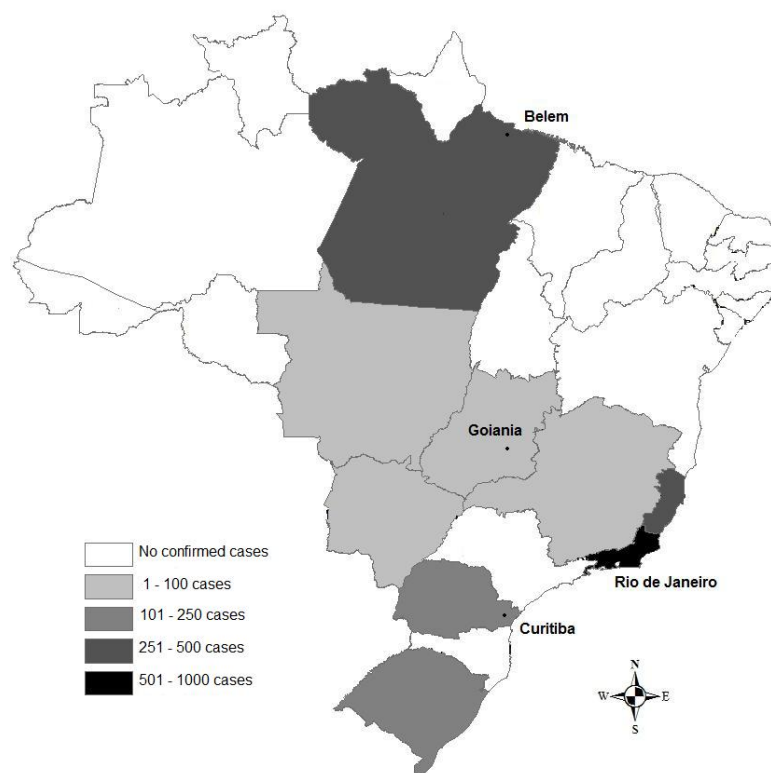


Figura 14 - Mapa com os casos confirmados de infecções por micobactérias de crescimento rápido, no período de 2001-2008 segundo dados fornecidos pela ANVISA.

O sequenciamento do DNA é considerado o melhor método para discriminar espécies muito relacionadas, como é o caso das MCR (VIANA-NIERO *et al.*, 2008). A análise do gene *rpoB* neste estudo, foi essencial para a identificação dos isolados de *M. massiliense*, e a diferenciação destes de isolados de *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* que não apresentaram relação com o surto.

Estudos envolvendo a técnica de PFGE com cepas de *M. tuberculosis* mostrou diferentes resultados com relação ao poder discriminatório de diversas enzimas de restrição. Zhang *et al.* (1992) demonstrou que a *XbaI* e *SpeI* são mais discriminatórias que a *Asel* e *DraI*. Em contraste, outros autores reportaram que a *DraI* é mais discriminatória que a *XbaI* (FEIZABADI *et al.*, 1997). Nosso estudo demonstrou que o poder discriminatório destas quatro enzimas foi o mesmo quando testado em isolados de *M. massiliense*. Porém, a visualização e reprodutibilidade do teste foi melhor obtido com a enzima *DraI*. De acordo com os resultados obtidos, consideramos o método de PFGE uma ferramenta eficaz para avaliar o padrão molecular e a origem clonal de isolados de *M. massiliense*. Nossos resultados mostram que um único clone de *M. massiliense* pode ser o responsável por infecções que ocorreram em diferentes regiões do país (CARDOSO *et al.*, 2008; VIANA-NIERO *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2009).

Infecções pós-cirúrgicas causadas por MCR comumente se manifestam várias semanas ou meses após o procedimento cirúrgico ser realizado. Neste estudo o tempo para a manifestação dos sinais clínicos variou entre 5 e 60 dias. Autores relataram um período de incubação semelhante, compreendido entre sete e 152 dias, ao estudarem um surto de infecções subcutâneas

causadas por *M. chelonae* após injeções de mesoterapia (CARBONNE *et al.*, 2009). Dados epidemiológicos do surto de *M. massiliense* ocorrido em Goiânia indicam que os pacientes manifestaram os sinais clínicos entre um e 14 meses (CARDOSO *et al.*, 2008), semelhante ao período de um a 16 meses descrito por Sampaio *et al.* (2006), em casos de infecções após mamoplastia causadas por *M. fortuitum*.

Manifestações clínicas características dos pacientes deste estudo incluíram eritema, formação de nódulos subcutâneos e formação de abscessos. Autores relatam que quadros de infecção disseminada por MCR são incomuns, embora possam ocorrer especialmente em pacientes imunossuprimidos (FOX *et al.*, 2004). Neste estudo, ocorreram dois relatos de óbito devido à infecção disseminada, mesmo os pacientes sendo imunocompetentes. A suspeita clínica precoce e um correto diagnóstico microbiológico são essenciais na redução da morbidade e mortalidade dos pacientes.

Trinta e três (84,6%) dos 39 pacientes incluídos no estudo foram tratados com uma combinação de amicacina, claritromicina e terizidona. MCR tem se mostrado mais sensíveis aos aminoglicosídeos, como a amicacina, e a realização de tratamento com múltiplos agentes é preferível, devido a uma elevada taxa de recidiva e do surgimento de resistência às drogas (DALOVISIO *et al.*, 1981).

Autores relatam que os macrolídeos geralmente apresentam melhor atividade contra as espécies de MCR, e entre eles, a claritromicina é a mais eficiente (BROWN *et al.*, 1992). Assim, esta droga tem sido recomendada como antimicrobiano de primeira linha em infecções causadas por MCR

(BROWN-ELLIOTT e WALLACE, 2002; GRIFFITH *et al.*, 2007), porém óbitos tem sido associados à cepas resistentes à claritromicina (SANGUINETTI *et al.*, 2001; TORTOLI *et al.*, 2008). Neste estudo, a claritromicina apresentou a melhor atividade contra as MCR, quando testada *in vitro* e comparada com outras drogas. Koh *et al.* (2011) estudaram a resposta no tratamento de pacientes infectados com *M. massiliense* e concluíram que houve uma excelente melhora quando utilizada uma terapia antimicrobiana combinada com claritromicina. Nossos resultados de susceptibilidade *in vitro* associados com a ótima resposta dos pacientes deste surto à claritromicina, sugerem que esta droga deve ser a terapia de escolha para infecções cutâneas causadas por *M. massiliense*. Porém deve-se ter cautela na escolha do protocolo utilizado para o tratamento de infecções por MCR, visto que a resistência à claritromicina tem sido reportada com uma taxa de 10% em pacientes submetidos à monoterapia com esta droga (WALLACE *et al.*, 1985; WALLACE *et al.*, 1993, WALLACE *et al.*, 1996).

Com relação à amicacina, um estudo relatou que 95% dos *M. abscessus*, 99% dos *M. fortuitum* e 88% dos isolados de *M. chelonae* foram inibidos por esta droga (SWENSON *et al.*, 1985). Nossos resultados concordam com este estudo, visto que este agente apresentou boa atividade contra todos os nossos isolados. Devido ao risco de desenvolvimento de resistência em pacientes submetidos a monoterapia com claritromicina, recomenda-se a escolha de uma segunda droga no tratamento destas infecções, sendo a amicacina uma boa candidata a esta associação.

Outra droga que é geralmente associada com claritromicina no tratamento de infecções por MCR é a cefoxetina (SCHOLZE *et al.*, 2005), no

entanto nossos resultados mostram que os isolados de *M. massiliense* apresentaram resistência a esta droga.

Todos isolados de *M. massiliense* deste estudo foram resistentes à doxiciclina *in vitro* e apresentaram o mesmo perfil observado nos isolados de outros surtos ocorridos no Brasil (CARDOSO *et al.*, 2008; VIANA-NIERO *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2009). Estes resultados também estão de acordo com estudos anteriores (SIMMON *et al.*, 2007; DE GROOTE e HUITT, 2006), porém divergem de alguns resultados nos quais a espécie foi descrita como susceptível (ADÉKAMBI e DRANCOURT, 2004) ou intermediária (KIM *et al.*, 2007) à doxiciclina. Nosso resultado reforça a idéia de que a susceptibilidade à doxiciclina não pode ser usada como um marcador para a diferenciação entre *M. abscessus* e *M. massiliense* (ADÉKAMBI *et al.*, 2004).

De acordo com o CLSI (2003) os resultados da tobramicina não devem ser reportados para o grupo *M. chelonae/abscessus* uma vez que o tratamento com este fármaco será superior a amicacina apenas nas infecções causadas por *M. chelonae*. Neste estudo o isolado de *M. chelonae* apresentou sensibilidade intermediária a esta droga. Nenhuma recomendação para o teste de susceptibilidade aos isolados de *M. massiliense* esta disponível, porém de acordo com nossos resultados, esta droga não deveria ser usada, visto que todos os isolados foram resistentes a tobramicina. Isolados de *M. massiliense* provenientes dos surtos em Goiânia e Rio de Janeiro (CARDOSO *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2009), apresentaram o mesmo perfil de resistência observado em nosso estudo.

Segundo dados fornecidos pelo CLSI (2003), todos os isolados de *M. chelonae* e *M. abscessus* apresentam resistência ao sulfametoxazol, enquanto

os isolados de *M. fortuitum* seriam sensíveis. Nossos resultados concordam quanto à resistência do *M. chelonae* e *M. abscessus* ao sulfametoxazol, porém divergem quanto à susceptibilidade do *M. fortuitum* a esta droga. A resistência ao sulfametoxazol também foi observada em todos os isolados de *M. massiliense* testados.

Os resultados da atividade *in vitro* da ciprofloxacina contra *M. chelonae* e *M. fortuitum* são semelhantes aos observados em estudos anteriores (HAEMERS *et al.*, 1989; WALLACE *et al.*, 1990). Quanto aos isolados de *M. massiliense*, nossos resultados indicam que esta droga não tem atividade inibitória contra este micro-organismo.

A Secretaria Estadual de Saúde do Paraná determinou que pacientes com infecções causadas por MCR devem ser submetidos a uma abordagem terapêutica combinada, com remoção cirúrgica do tecido necrótico e drenagem de secreções. Foi recomendado que pacientes envolvidos neste surto devem ser tratados com drogas antimicrobianas por um período mínimo de 3 meses, dependendo da manifestação clínica e da evolução do tratamento. Porém, a duração ótima da terapia antimicrobiana é ainda uma questão contraditória (EID *et al.*, 2007). Os pacientes deste estudo seguiram a indicação da Secretaria Estadual de Saúde do Paraná com um período mínimo de tratamento de três meses, com a maioria dos casos (n = 37; 94,9%) evoluindo para a cura. Não foi possível neste estudo acompanharmos os efeitos colaterais provocados pelo uso prolongado de antimicrobianos, principalmente do grupo dos aminoglicosídeos. Todavia, é importante salientar que 0,5% a 25% dos pacientes tratados com este tipo de droga manifestam sinais de ototoxicidade, podendo também apresentar neurotoxicidade e nefrotoxicidade.

Tobramicina pode causar alterações do equilíbrio, enquanto amicacina está envolvida com alterações auditivas. Um aspecto importante na toxicidade é que ela pode ter início após a droga ter sido suspensa, ou progredir mesmo com a retirada do medicamento (TAVARES *et al.*, 2007).

Ocorreram algumas limitações no presente estudo. Primeiro, apenas os casos mais graves foram incluídos causando a redução na disponibilidade de outros isolados para análise. Além disso, a falta de procedimentos padronizados e protocolos para o isolamento de MCR de materiais tornou difícil determinar as fontes de infecção e sua relação com instrumentos cirúrgicos e equipamentos. Uma vez que nenhum isolado ambiental foi obtido, não podemos definitivamente identificar a fonte das infecções cirúrgicas.

Neste estudo, todos os hospitais que tiveram casos de infecções devido ao *M. massiliense* usaram uma solução de glutaraldeído 2% para a desinfecção de instrumentos cirúrgicos que não podem ser esterilizados por autoclave, prática comumente adotada em hospitais. Por outro lado, dois hospitais localizados em Curitiba usavam a mesma solução comercial de glutaraldeído e não tiveram casos de infecções causadas por MCR até o momento. Este fato pode ser explicado por uma adequada limpeza mecânica realizada nesses hospitais, o que pode evitar a formação de biofilmes e a adesão de bactérias aos equipamentos (GOLLER e ROMEO, 2008). A presença de um único clone de *M. massiliense* tolerante ao glutaraldeído pode explicar parcialmente a ocorrência de surtos em quatro diferentes regiões do Brasil. Embora a formação de biofilmes possa contribuir para a tolerância a soluções bactericidas (SIMÕES *et al.*, 2005), esta sozinha não poderia explicar a ocorrência de um único clone em quatro cidades geograficamente distantes.

Duas hipóteses podem ser consideradas conforme observações: I. este clone já estava no ambiente por um longo tempo, e a pressão seletiva pelo uso do glutaraldeído 2% e a inadequada limpeza mecânica de instrumentos cirúrgicos facilitou a ocorrência de surtos ou II. este clone foi disseminado dentro de soluções comerciais de glutaraldeído não ativadas e a inadequada limpeza mecânica de instrumentos cirúrgicos facilitou o surgimento dos surtos. Algumas equipes médicas possuíam seu próprio instrumento, porém realizavam cirurgias em diferentes hospitais e até em diferentes cidades e estados. Uma inapropriada esterilização dos equipamentos por parte destas equipes médica pode também ter contribuído para a disseminação de um único clone em diferentes regiões.

Após o surto, a Resolução N° 8 da ANVISA, de 27 de fevereiro de 2009, foi publicada com o intuito de reduzir a ocorrência de infecções causadas por MCR nos serviços de saúde do nosso país. A resolução determina a suspensão da esterilização química por imersão, utilizando agentes esterilizantes líquidos, para os artigos invasivos usados em cirurgias abdominais e pélvicas convencionais, laparoscopias, mamoplastias e cirurgias plásticas como a lipoaspiração. Porém, muitos equipamentos usados nos procedimentos cirúrgicos, como os endoscópios, são termossensíveis e não podem ser autoclavados. Para a desinfecção destes equipamentos será necessário recorrer à esterilização gasosa automatizada, por meio de óxido de etileno, plasma de peróxido de hidrogênio ou vapor à baixa temperatura com gás formaldeído. Considerando-se a realidade da maioria dos hospitais no Brasil, estes métodos acabam apresentando desvantagens. Além destas técnicas necessitarem um maior tempo de esterilização, o retorno do material é

mais demorado devido ao processo ser realizado fora do hospital. Como alternativa, alguns dos equipamentos mais modernos já podem ser autoclavados; a esterilização a vapor é insuperável quanto à segurança, possibilidade de monitorização do processo, baixo custo e rapidez.

6.2 MUTAÇÕES NOS GENES *gyrA* E *gyrB* EM ISOLADOS RESISTENTES A CIPROFLOXACINA

Sequências de GyrA QRDR de espécies de micobactérias resistentes à quinolonas apresentam um resíduo de alanina na posição 90 (Ala-90) da subunidade A da DNA girase, no entanto espécies susceptíveis apresentam uma serina (GUILLEMIN *et al.*, 1998). Em nosso estudo, um total de 4/35 (11,4 %) isolados resistentes à ciprofloxacina apresentaram uma Ala-90 no gene *gyrA*, estando estes resultados de acordo com achados reportados previamente (GUILLEMIN e CAMBAU, 1998). Esta resistência à quinolonas poderia ser explicada pela falta, nesta posição, da função hidroxila desempenhada pela cadeia lateral da serina que é substituída pelo grupo metil da alanina. A presença de uma alanina nesta posição poderia diminuir a interação entre o complexo da girase A e as quinolonas, visto que o aminoácido na posição 90 é o resíduo mais frequentemente envolvido na resistência à quinolonas em *M. tuberculosis* e outras espécies bacterianas (BAGEL *et al.*, 1999; CAMBAU *et al.*, 1994; HUANG *et al.*, 2005; TAKIFF *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1993).

Resistência à quinolonas em *Mycobacterium* spp. tem sido predominantemente atribuída a mutações no gene *gyrA* e são frequentemente localizadas nos códons 90 e 94 (MUSSER, 1995; RAMAWAMY e MUSSER,

1998). Neste estudo, encontramos uma alta frequência (88.6%) de substituições no gene *gyrA* na posição 90 em 31 isolados de *M. massiliense* resistentes à ciprofloxacina, e todos os isolados com alterações possuíam uma Ala-90→Val, a mesma substituição reportada em cepas de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* (CHENG *et al.*, 2004; REGEL *et al.*, 1994). A substituição deste aminoácido não tem a capacidade de mudar a função da cadeia lateral, somente altera a conformação nesta localização. Assim, o impedimento estérico relacionado com o resíduo de valina poderia explicar a resistência encontrada em isolados que apresentaram a alteração Ala-90→Val. O isolado de *M. chelonae* apresentou a mesma substituição (Ala-90→Val) encontrada em *M. massiliense* e mostrou alto nível de resistência à ciprofloxacina.

Mutações pontuais (GCG→GTG) em nossos isolados apresentando a substituição Ala-90→Val não originaram um novo ponto de restrição na técnica de PFGE, assim o padrão foi o mesmo encontrado nas cepas BRA100, sendo que estas não apresentam uma substituição em Ala-90→Val. Assim, nós presumimos que neste surto existe uma única cepa, porém apresentando diversidade genética (isolados Val-90 e isolados Ala-90); e a alta frequência da substituição Ala-90→Val encontrada em nossos isolados poderia ser uma substituição característica presente nas cepas isoladas no sul do Brasil.

M. massiliense susceptível à ciprofloxacina apresentou uma substituição de Thr-80→Ala no gene *gyrA*, que tem sido reportada em isolados de *M. tuberculosis* (VON GROLL *et al.*, 2009). Essa substituição na posição 80 parece não ter um papel relevante na resistência à quinolonas e não foi observado em isolados resistentes. Assim, supomos que alguns isolados, como o isolado susceptível à ciprofloxacina encontrado neste estudo, já estaria

espalhado no ambiente e não foi trazido de outros estados; a pressão seletiva antes do surto poderia ser responsável por algumas mutações (Thr-80→Ala), mas não foi suficiente para mudar o perfil de susceptibilidade à ciprofloxacina.

É interessante observar que nenhuma substituição no códon 94 do gene *gyrA* foi observada nos isolados de *M. massiliense* testados; a ausência de substituição nesta posição não está de acordo com relatos anteriores em isolados de *M. tuberculosis*, onde tem-se descrito uma relativa equivalência de substituições quando comparado com o códon 90 (VON GROLL *et al.*, 2009; YIN e YU, 2010).

Em contraste, substituição no códon 94 foram encontradas nos isolados de *M. abscessus* (Asp-94→Gly) e *M. chelonae* (Asp-94→Asn), com o mesmo padrão de substituição anteriormente descrito em isolados de *M. tuberculosis* (YIN e YU, 2010). Os autores observaram que diferentes substituições nos aminoácidos na posição 94 resultaram em diferentes níveis de resistência às drogas (YIN e YU, 2010). Esse fato, poderia ser explicado pela diferenças nas propriedades químicas de aminoácidos que determinariam a ligação das quinolonas com a DNA girase. No entanto, nossos isolados de *M. abscessus* e *M. chelonae* mostraram valores de CIM similares, apesar de diferentes substituições no códon 94.

Neste estudo, todas as amostras foram coletadas para cultura microbiológica antes do tratamento dos pacientes com antimicrobianos e nenhum dos pacientes recebeu quinolonas por no mínimo quatro semanas antes dos procedimentos cirúrgicos. Assim, presumimos que a incidência de *M. massiliense* resistente à ciprofloxacina poderia ser devido à pressão seletiva causada pelo abuso de drogas antes da ocorrência destes casos.

Adicionalmente, uma possível explicação para a presença de diferentes valores de CIM obtidos em nossos isolados seria a ocorrência de um mecanismo semelhante ao observado em *S. aureus*, onde há o desenvolvimento de um alto nível de resistência à quinolonas durante a terapia ocorrendo em passos sequenciais, com um primeiro evento resultando em um moderado aumento no valor da CIM dependente da dose administrada (HORI *et al.*, 1993). Assim, a dosagem da ciprofloxacina recebida pelos pacientes em surtos anteriores também poderia ser responsável por diferentes valores de CIM observados na mesma cepa.

Foi observado que a substituição no aminoácido 90 resultou em diferentes níveis de resistência às drogas. Isolados de *M. massiliense* apresentando a substituição Ala-90→Val mostrou altos valores de CIM (8 µg/ml e ≥ 16 µg/ml). Em contraste, os valores mais baixo de CIM (4 µg/ml) foram encontrados em isolados que possuíam uma Ala-90. Assim, os valores de CIM nos isolados que apresentaram uma mudança de aminoácido (Ala-90→Val) foram 2-3 vezes mais alto que isolados apresentando somente uma Ala-90. Este valor é menor que valores encontrados em um estudo com *M. tuberculosis*, no qual os valores de CIM de quinolonas em cepas Ala-90→Val foram oito vezes mais alto que cepas que apresentaram Ala-90 (KOCAGOZ *et al.*, 1996). Embora tais achados indiquem que substituições em *gyrA* estão associadas com alto nível de resistência à ciprofloxacina em *M. massiliense*, diferenças na permeabilidade da parede celular (JARLIER e NIKAIDO, 1994) e bombas de efluxo (BANERJEE *et al.*, 2000) podem influenciar a variação na susceptibilidade à quinolonas. As substituições de aminoácidos no isolado de

M. chelonae não foi correlacionada a um mais alto nível de resistência à quinolonas, o qual tem sido previamente descrito (YIN e YU, 2010).

Em nosso estudo, substituições no gene *gyrA* foi altamente observada, enquanto nenhuma alteração foi encontrada no gene *gyrB*; este fato foi similar a alta taxa de substituições observadas em *gyrA* quando comparadas com *gyrB* em isolados de *M. tuberculosis* (HUANG *et al.*, 1997; SIDDIQI *et al.*, 2002). A baixa prevalência de substituições em *gyrB* pode sugerir que tais alterações são secundárias as encontradas no gene *gyrA* com relação a susceptibilidade à quinolonas.

Autores reportaram que, a análise somente baseada no gene *rpoB* seria considerada insuficiente para diferenciar espécies de micobactérias muito relacionadas (LEÃO *et al.*, 2010); métodos moleculares envolvendo o gene *erm(41)* e os genes *gyrA/gyrB* tem sido considerados eficientes para a identificação diferencial entre *M. massiliense*, *M. abscessus* e *M. bolletii* (KIM *et al.*, 2010). Neste estudo, a sequência de nucleotídeos dos genes *gyrA* (120bp) e *gyrB* (117bp) em *M. massiliense* foram idênticas entre as sequências apresentando Ala-90 e as sequências com substituição em Ala-90→Val. Assim, a análise do gene *gyrA gyrB* foi capaz de discriminar *M. massiliense* de outras sequências de micobactérias disponíveis (GUILLEMIN *et al.*, 1995; DAUENDORFFER *et al.*, 2003), mesmo estas sequências apresentando uma alta similaridade (98,3% e 97,4% respectivamente) quando comparadas com a sequência de *M. abscessus* (DAUENDORFFER *et al.*, 2003).

6.3 BOMBAS DE EFLUXO E PERFIL DE RESISTÊNCIA EM MCR

O tratamento de infecções causadas por MCR é complicado, devido a diferenças de susceptibilidade entre as espécies e a variação individual entre

cepas da mesma espécie. Assim, é importante sabermos o perfil de susceptibilidade de cada isolado antes de iniciarmos o tratamento dos pacientes (DE GROOTE e HUITT, 2006). Diferenças individuais ocorrem devido a capacidade das micobactérias em desenvolver resistência por meio de diferentes mecanismos. A presença de mutações em genes relacionados a resistência à quinolonas (GUILLEMIN *et al.*, 1998) e macrolídeos (WALLACE *et al.*, 1996) têm sido descrito na literatura; e o estudo envolvendo bombas de efluxo em cepas de micobactérias com resistência múltipla às drogas tem recebido especial atenção. Entre as MCR, duas bombas de efluxo têm sido descritas: LfrA isolada de *M. smegmatis* (TAKIFF *et al.*, 1996) e Tap isolada de *M. fortuitum* (AINSA *et al.*, 1998).

Neste estudo, o gene *lfrA* foi detectado em 28 isolados, três dos quais foram sensíveis à ciprofloxacina *in vitro*. Acreditamos que este resultado ocorreu devido a problemas na expressão do gene *lfrA* ou mesmo em seu mecanismo regulatório, visto que a expressão de *lfrA* é controlada por outro gene, *lfrR*, e isso poderia ser afetado pela presença de substratos específicos (BURONI *et al.*, 2006). A presença de cepas resistentes à quinolonas com resultados negativos para a presença de *lfrA* pode ser explicada pela presença de outros mecanismos de resistência, como mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* reportadas previamente (GOSWITZ *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1993). Os valores de CIM em isolados resistentes à ciprofloxacina foram maiores (CIM \geq 16 mg/L) em isolados positivos para o gene *lfrA*, que valores encontrados (CIM 4 - 8 mg/L) em isolados negativos para este gene.

Autores consideram a possibilidade da proteína Tap transportar outros substratos, e possivelmente a habilidade de remover antimicrobianos não seria

a primeira função fisiológica desta bomba de efluxo (NEYFAKH, 1997). Neste estudo, a maioria dos isolados resistentes foram positivos para o gene *tap*. No entanto, foi detectado tanto isolados positivos para *tap* e sensível à doxiciclina como isolados negativos para *tap* e resistentes à doxiciclina. Este resultado pode ser explicado pela presença de outros mecanismos de resistência em isolados negativos para *tap*, porém resistentes à doxiciclina. A detecção de genes inativos, devido à presença de mutações e/ou modificações no sistema regulatório destes, pode ser uma possível explicação para a presença de isolados positivos para *tap*, porém sensíveis à doxiciclina.

Estudos mostram que a presença da proteína Tap pode alterar a estrutura da membrana e a permeabilidade celular, resultando em diferentes níveis de resistência aos antimicrobianos (AINSA *et al.*, 1998). No entanto, os valores de concentração inibitória mínima obtidos neste estudo para a doxiciclina (CIM \geq 32 mg/L) não apresentaram uma diferença significativa entre os isolados positivos para *tap* e os isolados negativos para a presença deste gene.

Com relação a análise filogenética, as sequências do gene *lfrA* mostraram uma alta similaridade entre os isolados clínicos de *M. massiliense*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* estudados. Na análise do gene *tap*, a sequência do *M. fortuitum* não apresentou igual similaridade quando comparada aos demais isolados clínicos. Este fato, poderia ser explicado pela diferente pressão seletiva sofrida pelos isolados deste estudo visto que, os isolados de *M. fortuitum* positivos para o gene *tap* apresentaram susceptibilidade à doxiciclina.

A ativação da transcrição de bombas de efluxo tem sido descrita como um potencial mecanismo de resistência em biofilmes (ESTEBAN *et al.*, 2008). Nestas estruturas, os genes que codificam para estas bombas podem ser ativados pelo sensor de quorum bacteriano, assim bactérias poderiam desenvolver resistência fenotípica mesmo quando são consideradas susceptíveis em testes convencionais. Devido a capacidade de MCR formar biofilmes (ESTEBAN *et al.*, 2008), presumimos que a presença destes genes nestas cepas pode ser considerado um mecanismo de resistência que leva à falhas clínicas com relação a susceptibilidade *in vitro* destas drogas (ZHANG e MAH, 2008).

7. CONCLUSÃO

Este estudo descreveu a clonalidade entre as cepas de *M. massiliense* recuperadas de um surto em Curitiba e sua similaridade genotípica com cepas recuperadas de surtos em diferentes partes do país, o que reforça o conceito de *M. massiliense* BRA100 como um patógeno emergente no ambiente cirúrgico hospitalar. O estado do Paraná não possuía diagnóstico molecular para identificar e caracterizar isolados de MCR, que eram enviados para o Centro de Referência Professor Hélio Fraga, gerando assim uma espera de aproximadamente 2 meses para a obtenção dos resultados. A implantação desta ferramenta no estado do Paraná resultou num diagnóstico mais rápido auxiliando assim nas medidas de controle e tratamento dos pacientes.

Com relação ao estudo dos genes *gyrA* e *gyrB*, pelo conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo de resistência aos antimicrobianos em isolados de *M. massiliense*. Encontramos uma frequente substituição (Ala-90→Val) no gene *gyrA* e nenhuma alteração foi observada no gene *gyrB* em isolados de *M. massiliense* resistentes à ciprofloxacina. Futuros estudos devem ser conduzidos para estabelecer inteiramente o mecanismo de resistência à quinolonas.

Observamos, ao estudar as bombas de efluxo, que bombas de efluxo Tap são amplamente distribuídas em isolados clínicos de MCR coletadas na região sul do Brasil, enquanto bombas de efluxo LfrA são menos frequentes nestes isolados. Este estudo, segundo conhecimento dos autores, foi o primeiro estudo a encontrar uma relação estatística significativa entre a presença das bombas de efluxo e a resistência a antimicrobianos em isolados clínicos de micobactérias de crescimento rápido.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, p. 146-151, 1940.

ADEKAMBI, T.; COLSON, P.; DRANCOURT, M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5699–5708, 2003.

ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2095-2105, 2004.

ADÉKAMBI, T.; REYNAUD-GAUBERT, M.; GREUB, G. “Amoebal coculture of *Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5493–5501, 2004.

ADÉKAMBI, T.; SALAH, S.B.; KHLIF, M.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Survival of Environmental Mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5974-5981, 2006.

AINSA, J.A.; PEREZ, E.; PELICIC, V.; BERTHET, F.X.; GICQUEL, B.; MARTIN, C. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the *aac(2')-Ic* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2')-Id* gene from *Mycobacterium smegmatis*. **Molecular Microbiology**, v. 24, p.431–441, 1997.

AINSA, J.A.; BLOKPOEL, M.C.; OTAL, I.; YOUNG, D.B.; DE SMET, K.A.; MARTIN, C. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p.5836–5843, 1998.

ALFA, M.J.; SISLER, J.J.; HARDING, G.K.M. *Mycobacterium abscessus* infection of a norplant contraceptive implant site. **Canadian Medical Association Journal**, v. 153, n. 9, p. 1293-1296, 1995.

ALANGADEN, G.J.; LERNER, S.A. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. **Clinical of Infectious Disease**, v. 25, p. 1213-1221, 1997.

ANALSSIE, E.J.; PENZAK, S.R.; DIGMA, C. The hospital water supply as a source of nosocomial infections. **Archives of Internal Medicine**, v. 162, p.1483-1492, 2002.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica - Módulo VI, 2004.

AZADIAN, B.S.; BECK, A.; CURTIS, J.R.; CHERRINGTON, L.E.; GOWER, P.E.; PHILLIPS, M.; EASTWOOD, J.B.; NICHOLLS, J. Disseminated infection with *Mycobacterium chelonae* in a haemodialysis patient. **Tuberculosis**, v. 2, p. 281-284, 1981.

BAGEL, S.; HÜLLEN, V.; WIEDEMANN, B.; HEISIG, P. Impact of *gyrA* and *parC* Mutations on Quinolone Resistance, Doubling Time, and Supercoiling Degree of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p.868-875, 1999.

BANERJEE, S.K.; BHATT, K.; MISRA, P.; CHAKRABORTI, P.K. Involvement of a natural transport system in the process of efflux-mediated drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **Molecular and General Genetics**, v. 262, p. 949–956, 2000.

BARRETO, J.A.; PALACI, M.; FERRAZOLI, L.; MARTINS, M.C.; SULEIMAN, J.; LORENÇO, R.; FERREIRA, O.C.; RILEY, L.W.; JOHNSON, W.D.; GALVÃO, P.A. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from bone marrow aspirates of AIDS patients. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 168, p.777-779, 1993.

BEST, M.; SATTAR, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S.; KENNEDY, M.E. Comparative mycobactericidal efficacy of chemical disinfectants in suspension and carrier tests. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2856-2858, 1988.

BIEHLE, J.R.; CAVALIERI, S.J.; SAUBOLLE, M.A.; GETSINGER, L.J. Evaluation of Etest for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 760-1764, 1995.

BLACKWOOD, K.S.; HE, C.; GUNTON, J.; TURENNE, C.Y.; WOLFE, J.; KABANI, A.M. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2846–2852, 2000.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BRENWALD, N.P.; GILL, M.J.; WISE, R. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p.2032–2035, 1998.

BRENNAN, P.J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual Reviews on Biochemistry**, v. 64, p.29–63, 1995.

BRENNAN, P.J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 83, p. 91–97, 2003.

BROWN-ELLIOTT, B.A., R.J. WALLACE, G.O. ONYI, V. DE ROSAS AND R.J. WALLACE. Activities of four macrolides, including clarithromycin, against *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium chelonae*-like organisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 180–184, 1992.

BROWN-ELLIOTT, B.A.; WALLACE, R.J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. **Clinical Microbiology Review**, v.15, p. 716–746, 2002.

BROSKEY, J.; COLEMAN, K.; GWYNN, M.N.; MCCLOSKEY, L.; TRAINI, C.; VOELKER, L.; WARREN, R. Efflux and target mutations as quinolone resistance mechanisms in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 1, p. 95–99, 2000.

BROWN-ELLIOTT, B.A.; GRIFFITH, D.E.; WALLACE, R.J. Newly described emerging human species of nontuberculous mycobacteria. **Infectious Disease of Clinical North American**, v. 16, n. 1, p.187-220, 2002.

BUSH, K.; GOLDSCHMIDT, R. Effectiveness of fluoroquinolones against Gram-positive bacteria. **Current Opinion on Investigational Drugs**, v. 1, p. 22–30, 2000.

BURONI, S.; MANINA, G.; GUGLIERAME, P.; PASCA, M.R.; RICCARDI, G.; DE ROSSI, E. LfrR is a repressor that regulates expression of the efflux pump LfrA in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p.4044–4052, 2006.

CAMBAU, E.; SOUGAKOFF, W.; BESSON, M.; TRUFFOT-PERNOT, C.; GROSSET, J.; JARLIER, V. Selection of a *gyrA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. **Journal of Infectious Disease**, v. 170, p. 479–483, 1994.

CARBONNE, A.; BROSSIER, F., ARNAUD, I.; BOUGMIZA, I.; CAUMES, E.; MENINGAUD, J.P.; DUBROU, S.; JARLIER, V.; CAMBAU, E.; ASTAGNEAU, P. Outbreak of nontuberculous Mycobacterial subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p.1961-1964, 2009.

CARDOSO, A.M.; MARTINS DE SOUSA, E.; VIANA-NIERO, C.; BONFIM DE BORTOLI, F.; PEREIRA DAS NEVES, Z.C.; LEÃO, S.C.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; KIPNIS, A. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes and Infection**, v. 10, p.1552-1557, 2008.

CATHERINOT, E; CLARISSOU, J.; ETIENNE, G.; RIPOLL, F.; EMILE, J.F.; DAFFÉ, M.; PERRONNE, C.; SOUDAIS, C.; GAILLARD, J.L.; ROTTMAN, M. Hypervirulence of a Rough Variant of the *Mycobacterium abscessus* Type Strain. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 1055-1058.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 369–413, 2001.

CHENG, A.F.; YEW, W.W.; CHAN, E.W.; CHIN, M.L.; HUI, M.M.; CHAN, R.C. Multiplex PCR amplimer conformation analysis for rapid detection of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 596–601, 2004.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 232–260, 2001.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute Quality Manual, 3rd edn. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

COLEMAN, N.V.; SPAIN, J.C. Distribution of the coenzyme M pathway of epoxide metabolism among ethene- and vinyl chloride-degrading *Mycobacterium* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6041-6046, 2003.

CONVILLE, P.S.; WITEBSKY, F.G. Lack of Usefulness of Carbon Utilization Tests for Identification of *Mycobacterium mucogenicum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2725-2728, 2001.

COOPER, B.; LAWLOR, M. Pneumococcal bacteremia during ciprofloxacin therapy for pneumococcal pneumonia. **American Journal of Medicine**, v. 87, p.475, 1989.

COOPER, A.M.; DALTON, D.K.; STEWART, T.A.; GRIFFIN, J.P.; RUSSELL, D.G.; ORME, I.M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 6, p. 2243-2247, 1993.

COOPER, A.M.; KIPNIS, A.; TURNER, J.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; ORME, I.M. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 3, p.1322-1327, 2002.

CULLEN, A.R.; CANNON, C.L.; MARK, E.J.; COLIN, A. A. *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 641–645, 2000.

DALOVISIO, J.R.; PANKEY, G.A.; WALLACE, R.J. Clinical usefulness of amikacin and doxycycline in the treatment of infection due to *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. **Reviews on Infectious Disease**, v. 3, p. 1068-1074, 1981.

DAUENDORFFER, J.N.; GUILLEMIN, I.; AUBRY, A. Identification of mycobacterial species by PCR sequencing of quinolone resistance determining regions of DNA gyrase genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p.1311–1315, 2003.

DAVIDSON, P. T. The diagnosis and management of disease caused by *M. avium* complex, *M. kansasii* and other mycobacteria. **Clinic in Chest Medicine**, v. 10, n. 3, p. 59-63, 1989.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p.847-867, 2000.

DE GROOT, M.A.; HUITT, G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. **Clinical Infectious Disease**, v. 42, p. 1756-1763, 2006.

DEVALLOIS, A.; GOH, K.S.; RASTOGI, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp 65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 4 mycobacterial species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p.2969-2973, 1997.

DE ROSSI, E.; BLOKPOEL, M.C.; CANTONI, R.; BRANZONI, M.; RICCARDI, G.; YOUNG, D.B.; DE SMET, K.A.; CIFERRI, O. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1931–1937, 1998.

DE ROSSI, E.; ARRIGO, P.; BELLINZONI, M.; SILVA, P.A.; MARTIN, C.; AINSA, J.A.; GUGLIERAME, P.; RICCARDI, G. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Medicine**, v. 8, p. 714–724, 2002.

DOMAGALA, J. M.; HANNA, L. D.; HEIFETZ, C. L.; HUTT, M. P.; MICH, T. F.; SANCHEZ, J. P.; SOLOMON, M. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 394-404, 1986.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 377-392, 1997.

DUARTE, R.S.; LOURENÇO, M.C.; FONSECA, L.; LEÃO, S.C.; AMORIM, E.L.; ROCHA, I.L.; COELHO, F.S.; VIANA-NIERO, C.; GOMES. An Epidemic of Postsurgical Infections Caused by *Mycobacterium massiliense*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p.2149-2155, 2009.

EID, A.J.; BERBARI, E.F.; SIA, I.G.; WENGENACK, N.L.; OSMON, D.R.; RAZONABLE, R.R. Prosthetic joint infection due to rapidly growing mycobacteria: report of 8 cases and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 687-694, 2007.

ESTEBAN, J.; CABRIA, F. Outbreak of Infection with *Mycobacterium abscessus*: Is Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis a Useful Technique for Epidemiological Typing? **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.915, 2003.

ESTEBAN, J.; MARTÍN-DE-HIJAS, N.Z.; KINNARI, T.J.; AYALA, G.; FERNÁNDEZ-ROBLAS, R.; GADEA, I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **BMC Microbiology**, v. 8, p.184, 2008.

ESTEBAN, J.; MARTIN-DE-HIJAS, N.Z.; FERNANDEZ, A.I.; FERNANDEZ-ROBLAS, R.; GADEA, I. Epidemiology of infections due to Non-pigmented Rapidly Growing *Mycobacteria* diagnosed in an urban area. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 951–957, 2008.

ETIENNE, G. ; VILLENEUVA, C. ; BILLMAN-JACOB, H. ; ASTARIE-DEQUEKER, C. ; DUPONT, M.A. ; DAFTE, M. The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. **Microbiology**, v. 148, p.3089–3100, 2002.

FALKINHAM, J.O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical of Microbiology Reviews**, v. 9, p.177-215, 1996.

FEIZABADI, M.M.; ROBERTSON, I.D.; EDWARDS, R.; COUSINS, D.V.; HAMPSON, D.J. Genetic differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Medicine Microbiology**, v. 46, p. 501-505, 1997.

FERNANDES, P.; FERREIRA, B.S.; CABRAL, J.M. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p.211–216, 2003.

FLYNN, J.L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n.1, p.93-129, 2001.

FRASER, V.J.; JONES, M.; MURRAY, P.R.; MEDOFF, G.; ZHANG, Y.; WALLACE, JR. Contamination of flexible fiberoptic bronchoscopes with *Mycobacterium chelonae* linked to an automated bronchoscope disinfection machine. **American Review of Respiratory Diseases**, v. 145, p. 853-855, 1992.

FREITAS, D.; ALVARENGA, L.; SAMPAIO, J.; MANNIS, M.; SATO, E.; SOUSA, L.; VIEIRA, L.; YU, M.C.; MARTINS, M.C.; HOFFLING-LIMA, A.

BELFORT JR., R. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. **Ophthalmology**, v. 110, p. 276-285, 2003.

FOX, G.E., WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK, P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identification. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 166–170, 1992.

FOX, L.P.; GEYER, A.S.; HUSAIN, S.; DELLA-LATTE, P.; GROSSMAN, M.E. *Mycobacterium abscessus* cellulitis and multifocal abscesses of the breasts in a transsexual from illicit intramammary injections of silicone. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, p. 450–454, 2004.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.678,1999.

GALIL, K.; MILLER, L.A.; YAKRUS, M.A. ; WALLACE JR., R.J.; MOSLEY, D.G.; ENGLAND, B.; HUITT, G.; MCNEIL, M.M.; PERKINS, B.A. Abscesses due to *Mycobacterium abscessus* linked to injection of unapproved alternative medication. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p.681-687, 1999.

GINSBURG, A.S.; GROSSET, J.H.; BISHAI, W.R. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p.432–442, 2003.

GOLLER, C.; ROMEO, T. Environmental Influences on Biofilm Development. p. 37-66. *In* T. Romeo (ed.) *Bacterial Biofilms, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol. 322. Springer, 2008.

GÓMEZ, N.A. Micobacterias no tuberculosas: ¿una infección emergente? **Anales de Pediatría**, v. 71, p.185-188, 2009.

GOMILA, M.; RAMIREZ, A.; LALUCAT, J. Diversity of Environmental *Mycobacterium* Isolates from Hemodialysis Water as Shown by a Multigene Sequencing Approach. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3787-3797, 2007.

GOSWITZ, J.J.; WILLARD, K.E.; FASCHING, C.E.; PETERSON, L.R. Detection of *gyrA* gene mutations associated with ciprofloxacin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: analysis by polymerase chain reaction and direct DNA sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p.1166-1169, 1992.

GRIFFITH, D.E.; AKSAMIT, T.; BROWN-ELLIOT, B.A.; CATANZARO, A.; DALEY, C.; GORDIN, F.; HOLLAND, S.M.; HORSBURGH, R.; HUITT, G. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, p. 367–416, 2007.

GUILLEMIN, I.; CAMBAU, E.; JARLIER, V. Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium*: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2145–2149, 1995.

GUILLEMIN, I.; JARLIER, V.; CAMBAU, E. Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 2084–2088, 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HALL-STOODLEY, L.; LAPPIN-SCOTT, H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.168, p. 77-84, 1998.

HAN, X.Y.; PHAM, A.S.; TARRAND, J.J.; SOOD, P.K.; LUTHRA, R. Rapid and accurate identification of mycobacteria by sequencing hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA gene. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 118, p. 796–801, 2002.

HOGAN, D.; KOLTER, R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 472–477, 2002.

HOPKINS, K. L.; DAVIES, R. H.; THRELFALL, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 5, p. 358-373, 2005.

HOOPER, D. C. Mechanism of fluoroquinolone resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 2, n.1, p. 38-55, 1999.

HORI, S.; OHSHITA, Y.; UTSUI, Y.; HIRAMATSU, K. Sequential acquisition of norfloxacin and ofloxacin resistance by methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 2278-2284, 1993.

HOWARD, S.T.; RHOADES, E.; RECHT, J.; PANG, X.; ALSUP, A.; KOLTER, R.; LYONS, C.R.; BYRD, T.F. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. **Microbiology**, v. 152, p.1581-1590, 2006.

HUANG, T.S., KUNIN, C.M.; SHIN-JUNG LEE, S.; CHEN, Y.S.; TU, H.Z.; LIU, Y.C. Trends in fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a Taiwanese medical centre: 1995-2003. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 56, p.1058-1062, 2005.

ITO H.; YOSHIDA, H.; BOGAKI-SHONAI, M.; NIGA, T.; HAYTORI, H.; NAKAMURA, S. Quinolone Resistance Mutations in the DNA Gyrase *gyrA* and *gyrB* Genes of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p.2014-2023, 1994.

JANOIR, C.; ZELLER, V.; KITZIS, M.D.; MOREAU, N.J.; GUTMANN, L. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. **Antimicrobial Agents and Chemotherrpy**, 40: 2760–2764, 1996.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 123, p.11–18, 1994.

JORDAN, P.W.; STANLEY, T.; DONNELLY, F.M.; ELBORN, J.S.; MCCLURG, R.B.; MILLAR, B.C.; GOLDSMITH, C.E.; MOORE, J.E. Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 459-466, 2007.

KAWAMURA, I. Advances in understanding of the virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi**, v. 77, n. 3, p.219-224, 2008.

KIM, H.Y.; YUN, Y.J.; PARK, C.G.; LEE, D.H.; CHO, Y.K.; PARK, B.J.; JOO, S.I.; KIM, E.C.; HUR, Y.J.; KIM, B.J.; KOOK, Y.H. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p.3127-3130, 2007.

KIM, H.Y.; KOOK, Y.; YUN, Y.J.; PARK, C.G.; LEE, N.Y.; SHIM, T.S.; KIM, B.J.; KOOK, Y.H. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae* - *Mycobacterium abscessus* group isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, p.3384-3390, 2008.

KIM H.; KIM, B.J.; KOOK, Y.; YUN, Y.; SHIN, J.H.; KIM, B.; KOOK, Y. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p. 347–353, 2010.

KLYACHKO, K.A.; NEYFAKH, A.A. Paradoxical enhancement of the activity of a bacterial multidrug transporter caused by substitutions of a conserved residue. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 2817–2821, 1998.

KOCAGOZ T.; HACKBARTH, C.J.; UNSAL, I.; ROSENBERG, E.Y.; NIKAIDO, H.; CHAMBERS, H.F. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1768-1774, 1996.

KOH, W.J.; JEON, K.; LEE, N.Y. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 3, p. 405-410, 2011.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR.; W.C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**, 5 ed. Editora Medsi, Rio de Janeiro, p. 903-963, 2001.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA, G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO, J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. **Practical handbook for phenotypic and genotypic identification of Mycobacteria**, 2004.

LEÃO, S.C.; TORTOLI, E.; VIANA-NIERO, C.; UEKI, S.Y.; LIMA, K.V.; LOPES, M.L.; YUBERO, J.; MENENDEZ, M.C.; GARCIA, M.J. Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests a revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-abscessus* group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p.2691-2698, 2009.

LEÃO, S.C., C. VIANA-NIERO, C.K. MATSUMOTO, K.V.B. LIMA, M.L. LOPES, M. PALACI, D.J. HADAD, S. VINHAS, R.S. DUARTE, M.S. LOURENCO, A. KIPNIS, Z.C. NEVES, B.M. GABARDO, M.O. RIBEIRO, L. BAETHGEN, D.B. ASSIS, G. MADALOSSO, E. CHIMARA AND M.P. DALCOMO. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in **Future Microbiology**, v. 5, p. 971-980, 2010.

LEÃO, S.C.; TORTOLI, E.; EUZÉBY, J.P.; GARCIA, M.J. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 6, p.2311-2313, 2011.

LEVY-FÉBRAUTY, V.V.; PORTALES, F. Proposes minimal standards for the genus *mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p.315-323, 1992.

LEVY, S.B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 65–71, 2002.

LI, X.Z.; LIVERMORE, D.M.; NIKAIDO, H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1732–1741, 1994.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H.; POOLE, K. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1948–1953, 1995.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, v. 64, p.159–204, 2004.

LIU, J.; ROSENBERG, E.Y.; NIKAIDO, H. Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 92, p. 11254–1128, 1995.

LIU, J.; TAKIFF, H.E.; NIKAIDO, H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 3791–3795, 1996.

LOMOVSKAYA, O.; WATKINS, W. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p.225–236, 2001.

MARTINS, M.C. **Estudo crítico da utilização das técnicas de biologia molecular na detecção e identificação de micobactérias, em especial, *Mycobacterium tuberculosis***. São Paulo, Faculdade de saúde pública da USP, 2000.

MATTHIAS, D. Infecções por Micobactérias. In: BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1988, p. 261-289.

MCMURRY, L.; PETRUCCI, R.E.; LEVY, S.B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 77, p. 3974–3977, 1980.

MCMURRAY, D.N. *Mycobacteria and nocardia*. In: Roberts GD. **Laboratory Procedures in Clinical Microbiology**. Springer-Verlag, Mayo Foundation, 1985.

MEYERS, H.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; MOORE, D.; CURRY, J.; TRUONG, C.; HANG Y. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection following liposuction. **Clinical Infectious Diseases** 34, 1500-1507, 2002.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de bacteriologia da tuberculose. Terceira edição, Rio de Janeiro, 2005.

MONTELLI, A.C.; SADATSUNE, T. Antibioticoterapia para o clínico. **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, p. 7, 2001.

MUSSER, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p.496–514, 1995.

NASH, K.A.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; WALLACE, R.J. A novel gene, *erm* (41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium*

abscessus but is absent from *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p.1367-1376, 2009.

NEYFAKH, A.A. Natural functions of bacterial multidrug transporters. **Trends of Microbiology**, v. 5, p. 309–313, 1997.

NEYFAKH, A.A. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. **Molecular Microbiology**, v. 44, p.1123–1130, 2002.

NIEDERWEIS, M. Mycobacterial porins – new channel proteins in unique outer membranes. **Molecular Microbiology**, v. 49, p. 167–1177, 2003.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382–388, 1994.

NIKAIDO, H. Crossing the envelope: how cephalosporins reach their targets. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p. 22–26, 2000.

NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 12, p.215–223, 2001.

NORMARK, B.H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**, v. 252, p. 91–106, 2002.

OH, H.; STENHOFF, J.; JALAL, S.; WRETLIND, B. Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerase II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, p. 323–328, 2003.

ORAM, M.; FISHER, L.M. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified using the polymerase chain reaction. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p.387-389, 1991.

PAN, X.S.; AMBLER, J.; MEHTAR, S.; FISHER, L.M. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p.2321–2326, 1996.

PANG, Y.; BROWN, B.A.; STEINGRUBE, V.A.; WALLACE, R.J.; ROBERTS, M.C. Tetracycline resistance determinants in *Mycobacterium* and *Streptomyces* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p.1408–1412, 1994.

PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. **British Medical Journal**, London, v. 317, n. 7165, p. 1029-1030, 1998.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM, J.O. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clinical Microbiology Review**, v. 17, p.98-106, 2004.

PRING, M.; ECKHOFF, D.G. *Mycobacterium chelonae* Infection following a total knee arthroplasty. **Journal of Arthroplasty**, v. 11, p. 115-116, 1996.

RAMAN, L.A.; SIDDIQI, N.; SHAMIM, M.; DEB, M.; MEHTA, G.; HASNAIN, S.E. Molecular characterization of *Mycobacterium abscessus* strains isolated from a hospital outbreak. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, p.561-562, 2000.

RAMAWAMY, S.; MUSSER, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis Lung Disease**, v. 79, p. 23–29, 1998.

RASTOGI, N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. **Research Microbiology**, v. 142, p. 464-476, 2001.

ROCHA, A.S.; LEITE, C.C.; TORRES, H.M.; MIRANDA, A.B.; LOPES, M.Q.P.; DEGRAVE, W.M.; SUFFYS, P.N. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp 65 gene for rapid identification of mycobacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.223-229, 1999.

RUNYON, E.H. "Anonymous mycobacteria in pulmonary disease". **The Medical clinics of North America**, v. 43, n.1, p. 273–90, 1959.

RYAN, B.M.; DOUGHERTY, T.J.; BEAULIEU, D.; CHUANG, J.; DOUGHERTY, B.A.; BARRETT, J.F. Efflux in bacteria: what do we really know about it? **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 10, p.1409–1422, 2001.

REGEL, V.; CAMBAU, E.; JARLIER, V.; SOUGAKOFF, W. Characterization of mutations in *Mycobacterium smegmatis* involved in resistance to fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p.1991-1996, 1994.

RINGUET, H.; AKOUA-KOFFI, C.; HONORE, S.; VARNEROT, A.; VINCENT, V.; BERCHE, P.; GAILLARD, J.L.; PIERRE-AUDIGIER, C. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 852–857, 1999.

ROBERTS, M.C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Review**, v. 19, p.1–24, 1996.

ROBERTS, G.D. Mycobacteria and nocardia. In J.A. Washington (ed.), **Laboratory Procedures in Clinical Microbiology**. Springer-Verlag, Mayo Foundation, pp. 379–418, 1985.

RUIZ, J. Mechanism of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1109–17, 2003.

RYAN, B.M.; DOUGHERTY, T.J.; BEAULIEU, D.; CHUANG, J.; DOUGHERTY, B.A.; BARRETT, J.F. Efflux in bacteria: what do we really know about it? **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 10, p.1409–1422, 2001.

RYU, H.J.; KIM, W.J.; OH, C.H.; SONG, H.J. Iatrogenic *Mycobacterium abscessus* infection associated with acupuncture: clinical manifestations and its treatment. **International Journal of Dermatology**, v.44, p. 846-850, 2005.

SAMPAIO, J.L.; VIANA-NIERO, C.; DE FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A.L.; LEAO, S.C. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 55, p. 107-118, 2006.

SAMPAIO, J.L.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. **Clinical Microbiology Infection**, v. 12, p. 142-49, 2006.

SANDER, P.; DE ROSSI, E.; BODDINGHAUS, B.; CANTONI, R.; BRANZONI, M.; BOTTGER, E.C.; TAKIFF, H.; RODRIGUEZ, R.; LOPEZ, G.; RICCARDI, G. Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, p.19–23, 2000.

SANGUINETTI, M.; ARDITO, F.; FISCARELLI, E.; LA SORDA, M.; D'ARGENIO, P.; RICCIOTTI, G.; FADDA, G. Fatal pulmonary infection due to multidrug-resistant *Mycobacterium abscessus* in a patient with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 816-819, 2001.

SCIOR, T.; MENESES MORALES, I.; GARCES EISELE, S.J.; DOMEYER, D.; LAUFER, S. Antitubercular isoniazid and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* – a review. **Archives Pharmacology**, v. 335, p.511–525, 2002.

SCHOLZE, A.; LODDENKEMPER, C.; GRÜNBAUM, M.; MOOSMAYER, I.; OFFERMANN, G.; TEPEL, M. Cutaneous *Mycobacterium abscessus* infection after kidney transplantation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, p.1764-1765, 2005.

SHLAES, D. M. An update on tetracyclines. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 7, p.167-171, 2006.

SILVA, C.F.; UEKI, S.Y.M.; GEIGER, D.C.P.; LEÃO, S.C. hsp65 PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laborator y. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 43, p.25-28, 2001.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M.O.; VIEIRA, M.J. Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes. **Water Research**, v. 39, n. 2-3, p. 478-486, 2005.

SIMMON, K.E.; POUNDER, J.I.; GREENE, J.N.; WALSH, F.; ANDERSON, C.M.; COHEN, S.; PETTI, C.A. Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* sequencing of clinical isolates collected in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p.1978-1980, 2007.

SINGH, S.P.; SALAMON, H.; LAHTI, C.J.; FARID-MOYER, M.; SMALL, P.M. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Epidemiologic and Population Genetic Studies of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1927-1931, 1999.

SIDDIQI, N.; SHAMIM, M.; HUSSAIN, S.; CHOUDHARY, K.R.; AHMED, N.; PRACHEE, S.; BANERJEE, G.R.; SAVITHRI, M.; ALAM, N.; PATHAK, A.; AMIN, M.; HANIEF, V.M.; KATOCH, S.K.; SHARMA, S.; HASNAIN, E. Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Patients in North India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p.443-450, 2002.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYER A. A. Bacterial RESISTANCE TO TETRACYCLINES. **Clinical Microbiology Review**, v. 5, p. 387-389, 1992.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P.H.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P.L.; COLLINS, H.L.; FOK, A.K.; ALLEN, R.D.; GLUCK, S.L.; HEUSER, J.; RUSSEL, D.G. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton- ATPase. **Science**, v. 263, n. 5147, p.678-681, 1994.

SWENSON, J.M.; WALLACE, R.J.; SILCOX, V.A.; THORNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility of five subgroups of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 28, n. 6, p. 807–811, 1985.

TAKEWAKI, S.I.; OKUZUMI, K.; MANABE, I.; TANIMURA, M.; MIYAMURA, K.; NAKAHARA, K.I.; YAZAKI, Y.; OHKUBO, A.; NAGAI, R. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p.159–166, 1994.

TAKIFF, H.E.; CIMINO, M.; MUSSO, M.C.; WEISBROD, T.; MARTINEZ, R.; DELGADO, M.B. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **Proceedings of the National Academy of Science oh the USA**, v. 93, p. 362–366, 1996.

TANKOVIC, J.; PERICHON, B.; DUVAL, J.; COURVALIN, P. Contribution of mutations in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of

Streptococcus pneumoniae obtained in vivo and in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2505–2510, 1996.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E.C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p.175-178, 1993.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

THOMSEN, H.; IVANYI, J.; ESPITIA, C.; ARYA, A.; LONDEI, M. Human CD4-CD8- alpha beta + T-cell receptor T cells recognize different mycobacteria strains in the context of CD1b. **Immunology**, v. 85, n. 1, p.33-40, 1995.

TIWARI, T.S.; RAY, B.; JOST JR., K.C.; RATHOD, M.K.; ZHANG, Y.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; HENDRICKS, K.; WALLACE JR., R.J. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p.954-962, 2003.

TORTOLI, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. **Clinical Microbiology and Review**, v.16, p. 319–354, 2003.

TORTOLI, E.; GABINI, R.; GALANTI, I.; MARIOTTINI, A. Lethal *Mycobacterium massiliense* Sepsis, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 984, 2008.
TORTOLI, E.; GABINI, R.; GALANTI, I.; MARIOTTINI, A. Lethal *Mycobacterium massiliense* Sepsis, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 984, 2008.

TRUPIANO, J.K.; SEBEK, B.A.; GOLDFARB, J.; LEVY, L.R.; HALL, G.S.; PROCOP, G.W. Mastitis due to *Mycobacterium abscessus* after body piercing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p.131-134, 2001.

TAKIFF, H.E.; SALAZAR, L.; GUERRERO, C.; PHILIPP, W.; HUANG, W.M.; KREISWIRTH, B.; COLE, S.T.; JACOBS, W.L.; TELENTI, A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 38:773–780, 1994.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-39, 1995.

TAKIFF, H.E.; CIMINO, M.; MUSSO, M.C.; WEISBROD, T.; MARTINEZ, R.; DELGADO, M.B. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level

fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 93, p. 362–366, 1996.

USLAN, D.Z.; KOWALSKI, T.J.; WENGENACK, N.L.; VIRK, A.; WILSON, J.W. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria. **Archives of Dermatology**, v. 142, p.1287-1292, 2006.

VIANA-NIERO, C.; LIMA, K.V.; LOPES, M.L.; RABELLO, M.C.; MARSOLA, L.R.; BRILHANTE, V.C.; DURHAM, A.M.; LEAO, S.C. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.850-855, 2008.

VON ROSENSTIEL, N.; ADAM, D. Quinolone antibacterials. An update of their pharmacology and therapeutic use. **Drugs**, v. 47, p.872–901, 1994.

VON GROLL, A.; MARTIN, A.; JUREEN, P.; HOFFNER, S.; VANDAMME, P.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J.C.; SILVA, P.A. Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and Mutations in *gyrA* and *gyrB*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 4498–4500, 2009.

WALLACE, R.J.; SWENSON, J.M.; SILCOX, V.A.; BULLEN, M.G. Treatment of nonpulmonary infections due to *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* on the basis of in vitro susceptibilities. **Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 3, p. 500–514, 1985.

WALLACE, R.J., MUSSER, J.M., HULL, S.I., SILCOX, V.A., STEELE, L.C., FORRESTER, G.D., LABIDI, A. AND SELANDER, R.K. Diversity and sources of rapidly growing mycobacteria associated with infections following cardiac surgery. **Journal of Infectious Disease**, v. 159, p. 709-716, 1989.

WALLACE, JR.; R.J.; BROWN, B.A.; GRIFFITH, D.E. Nosocomial outbreaks/pseudo- outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 453-490, 1998.

WALLACE, R.J.; BROWN, B.A.; ONYI, G.O. Susceptibilities of *Mycobacterium fortuitum* biovar. *fortuitum* and the two subgroups of *Mycobacterium chelonae* to imipenem, cefmetazole, cefoxitin, and amoxicillin-clavulanic acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 773–775, 1991.

WALLACE, R.J.; SILCOX, V.A.; TSUKAMURA, M.; BROWN, B.A.; KILBURN, J.O.; BUTLER, W.R.; ONYI, G. Clinical significance, biochemical features, and susceptibility patterns of sporadic isolates of the *Mycobacterium chelonae*-like organism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 3231–3239, 1993.

WALLACE, R.J., A. MEIER, B.A. BROWN, Y. ZHANG, P. SANDER, G.O. ONYI AND E.C. BOTTGER. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p.1676–1681, 1996.

WALLACE, R.J.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; CRIST, C.J.; MANN, L.; WILSON, R.W. Comparison of the in vitro activity of the glycylcycline tigecycline (formerly GAR-936) with those of tetracycline, minocycline, and doxycycline against isolates of nontuberculous mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p.3164–3167, 2002.

WANG, Y.; HUANG, W.M.; TAYLOR, D.E. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* gyrA gene and characterization of quinolone resistance mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 457-463, 1993.

WILSON, R.W.; STEINGRUBE, V.A.; BOTTGER, E.C.; SPRINGER, B.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; VINCENT, V.; JOST JR., K.C.; ZHANG, Y.; GARCIA, M.J.; CHIU, S.H.; ONYI, G.O.; ROSSMOORE, H.; NASH, D.R.; WALLACE JR., R.J. Mycobacterium immunogenum sp. nov., a novel species related to Mycobacterium abscessus and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.1751-1764, 2001.

WINTHROP, K.L.; STEINBERG, E.B.; HOLMES, G.; KAINER, M.A.; WERNER, S.B.; WINQUIST, A.; VUGIA, D.J. Epidemic and sporadic cases of nontuberculous mycobacterial keratitis associated with laser in situ keratomileusis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 135, p.223-224, 2003.

WRIGHT, P.W.; WALLACE, R.J. Syndromes, diagnosis, and treatment of rapidly growing mycobacteria. In *Tuberculosis: Clinical Management and New Challenges*, pp. 373-389. Edited by M. R. R. Rossman. New York:McGraw-Hill, 1995.

WOODS, G.L. Susceptibility Testing for Mycobacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p.1209-1215, 2000.

YIN, X.; YU, Z. Mutation characterization of gyrA and gyrB genes in levofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China. **Journal of Infection**, v. 61, p.150-154, 2010.

YATES, M.D.; POZNIAK, A.; UTTLEY, A.H.C.; CLARKE, R.; GRANGE, J.M. Isolation of environmental mycobacteria from clinical specimens in south-east England. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, v. 1, p. 5-80, 1997.

ZHANEL, G.G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J.A.; HOBAN, D.J. The glycylcyclines: a comparative review with the tetracyclines. **Drugs**, v. 64, p. 63–88, 2004.

ZHANG, Y.; RAJAGOPALAN, M.; BROWN, B.A.; WALLACE JR., R.J. Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of

Mycobacterium abscessus strains from nosocomial outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 3132-3139, 1997.

ZHANG, L.; MAH, T.F. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 4447–4452, 2008.

ZHIBANG, Y.; BIXIA, Z.; QISHAN, L.; LIHAO, C.; XIANGQUAN, L.; HUAPING, L. Large-scale outbreak of infection with *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* after penicillin injection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2626–2628, 2002.

ZGURSKAYA, H.I.; NIKAIDO, H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 219–225, 2000.

ZOLG, J.W.; PHILIPPI-SCHULZ, S. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2801–2812, 1994.